UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 Thèse N° 279

Immunisation associée anti-tissulaire et anti-rhésus au cours des incompatibilités fœto-maternelles

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement

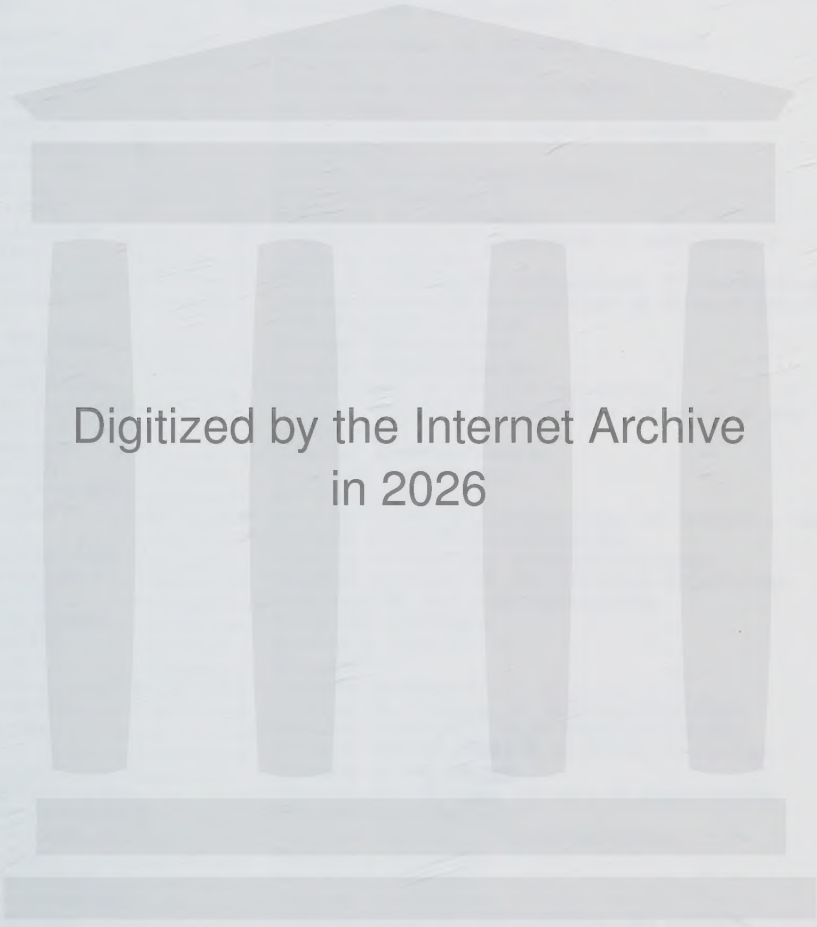
le Vendredi 27 Novembre 1970

par Marie-Claude MERLE
C.E.S. d'Immunologie et d'Hématologie
née le 19 Mai 1939 à RUFFEC (Charente)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M.	R. MAHON, Professeur	Président
M.	J. BENTÉGEAT, Agrégé	Juges
M.	C. MARTIN, Agrégé	
M.	J. MOULINIER, Maître de Conférences Associé	

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél 91-12-59 —



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0019

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. G. PORTMANN, R. SIGALAS, F. TAYEAU.
DOYEN : M. H. BRICAUD. — ASSESSEURS : MM. J. MASQUELIER, J. RIVIÈRE, Cl. BÉRAUD.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. CHARRIER, DUBREUIL, CREYX, DARGET, R. SIGALAS, G. PORTMANN, M. RIVIÈRE, R. GIRARD, C. PIFFAULT, R. FABRE, R. DUFOUR, P. FOURMENT, E. AUBERTIN, X. J. DUBECQ, L. MASSÉ, A. LACHAPÈLE, G. VITTE, J. DESPONS, G. DUBOURG, P. DELMAS-MARSALET, A. RIGAUD.

MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ HONORAIRE : M. BERGER.

MM.	PROFESSEURS TITULAIRES
P. DERVILLÉE	Médecine légale et Médecine du travail.
R. MANDOUL	Zoologie et parasitologie.
R. CASTAGNOU	Toxicologie et hygiène appliquée.
J. REBOUL	Carcinologie.
P. MESNARD	Chimie organique et Chimie analytique.
R. GRANDPIERRE	Physiologie.
P. BROUSTET	Clinique médicale cardiologique.
F. TAYEAU	Biochimie médicale A.
G. MAYER	Histologie et embryologie.
P. BLANQUET	Physique nucléaire appliquée et radiobiologie.
R. SARIC	Clinique médicale.
L. POUYANNE	Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique.
J.-J. DUBARRY	Hydro-climatologie thérapeutique et clinique des maladies de l'appareil digestif.
F.-J. TRAISSAC	Clinique thérapeutique.
R. MAHON	Clinique d'accouchements.
R. PAUTRIZEL	Immunologie et biologie parasitaire.
M[lle] G. ROUGIER	Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports.
G. MOUSTARDIER	Bactériologie.
E. BESSIÈRE	Clinique ophtalmologique.
H. LEGER	Anatomie pathologique.
J. MASQUELIER	Matière médicale.
G. MORETTI	Clinique médicale propédeutique et médecine tropicale.
N	Clinique oto-rhino-laryngologique.
P. LAUMONIER	Clinique chirurgicale pleuro-pulmonaire.
J. LENG-LÉVY	Clinique médicale et des maladies infectieuses.
R. LETAC	Pathologie et recherche chirurgicales.
R. QUILICHINI	Pharmacie galénique.
E. NEUZIL	Biochimie médicale B.
R. STOLL	Biologie.
J. LANGE	Clinique urologique.
P. FRÉOUR	Hygiène et Clinique de pneumophtisiologie.
J. FAURE	Médecine expérimentale et physiopathologie.
N	Clinique chirurgicale des maladies cardiaques.
J. VILLAR	Clinique gynécologique.
P. LE COULANT	Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.
M. BERGOUIGNAN	Clinique neurologique.
J. DUHAMEL	Physique médicale et pharmaceutique.
R. BABIN	Pharmacie chimique.
H. CHOUSSAT	Pathologie médicale.
L. CHASTRUSSE	Clinique obstétricale.
P. VERGER	Clinique médicale des maladies des enfants.
F. LAPORTE	Chirurgie générale.
R. TINGAUD	Clinique chirurgicale.
H. LAUBIE	Botanique et cryptogamie.
Cl. RICHIR	Anatomie pathologique.
R. GOLSE	Chimie générale et Chimie minérale.
J. BAILENGER	Zoologie et biologie animale.
J.-Cl. COLLETER	Chimie analytique.
H. BRICAUD	Médecine générale.
P. BENOIT	Clinique odonto-stomatologique.
Cl. MARTIN-DUPONT	Clinique néphrologique.
J. CANELLAS	Pharmacodynamie et hydrologie.
R. CANIVENC	Histologie.
G. DELORME	Electroradiologie.
J. DEPAULIS	Séméiologie chirurgicale.
J. RIVIÈRE	Séméiologie médicale.

PROFESSEURS TITULAIRES (suite)

MM.

H. DULONG DE ROSNAY...	Bactériologie.
R. CROCKETT.....	Chimie organique et chimie analytique.
R. DARMAILLACQ	Chirurgie générale.
H. POUYANNE.....	Clinique neuro-chirurgicale.
R. CASTAING	Réanimation respiratoire et anesthésiologie.
L. DOUTRE.....	Clinique chirurgicale A.
R. MARAUD.....	Histologie et embryologie.
H. CABANIÉ.....	Anatomie.

PROFESSEUR ASSOCIÉ

A. BAGHDIANTZ.....	Physique et chimie (Pharmacie).

PROFESSEURS SANS CHAIRE

J. DAVID-CHAUSSÉ.....	Médecine générale.
J. MARQUEVIELLE.....	Biochimie médicale.
M. BLANC.....	Neuro-psychiatrie.
Cl. MASSÉ.....	Chirurgie générale.
P. DU PASQUIER.....	Bactériologie.
J. STAEFFEN.....	Médecine générale.
J.-P. DUBECQ.....	Obstétrique.
G. NEVERRE.....	Physiologie.
J. MEUNIER.....	Histologie.
A. SERISÉ.....	Hygiène.
P. FERRET-BOUIN.....	Physique médicale.
J. VIDEAU.....	Anatomie.
P. BLANCHOT.....	Médecine générale.
P. LOISEAU	Neuro-psychiatrie.
Cl. VRIGNAUD.....	Physique pharmaceutique.
P. SOURREIL.....	Dermato-vénéréologie.
Cl. BÉRAUD.....	Thérapeutique.
Mlle S. LARCEBAU.....	Toxicologie.

MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS

P. BIRBIS.....	Chirurgie générale.
R. JENSEN.....	Chimie biologique.
J. BROUSSIN.....	Electroradiologie.
R. TESSIER.....	Pneumo-phtisiologie.
Mme J. SÉCHET.....	Biochimie médicale.
C. LAGARDE.....	Carcinologie.
H. LAZARINI.....	Médecine légale et Médecine du travail.
J. SOUMIREU-MOURAT....	Obstétrique.
G. CABANIEU.....	Médecine générale.
R. LE LOURD.....	Pneumo-phtisiologie.
L. COURAUD.....	Chirurgie générale.
J. BENTÉGEAT.....	Hématologie.
J. ROQUEBERT.....	Pharmacodynamie.
L. ARNÉ.....	Médecine générale et thérapeutique.
Cl. MARTIN.....	Pédiatrie.
R. BAUTE.....	Cryptogamie.
V. DARGELOS.....	Microbiologie.
M. GADRET.....	Chimie analytique.
C. WONÉ.....	Médecine générale et thérapeutique.
J. JULIEN.....	Médecine générale et thérapeutique.
J.-J. BATTIN.....	Pédiatrie.
M. DALLOCCHIO.....	Cardiologie et maladies vasculaires.
J. AUBERTIN.....	Maladies infectieuses.
P. VÉRIN.....	Ophtalmologie.
M. GOT.....	Neuro-chirurgie.
J. TAVERNIER.....	Electroradiologie : diagnostic et thérapeutique.
J. VINCENT.....	Physiologie et explorations fonctionnelles.
R. CHEVAIS.....	Anesthésiologie.
G. GILLARDEAU.....	Anesthésiologie.
J. HONTON.....	Orthopédie et traumatologie.
M. BOMBART.....	Orthopédie et traumatologie.
A. HUGUES.....	Cancérologie.
M. SABATHIÉ.....	Anesthésiologie.
E. JOUZIER	Chimie biologique (Pharmacie).

.../...

MAITRES DE CONFERENCES AGRÉGÉS (Suite)

MM.

F. COUSTOU..... Législation et déontologie pharmaceutique.
P. AUMONIER..... Pharmacie galénique.
A. BROUSTET..... Médecine interne.
J.-L. LATAPIE..... Médecine interne.
B. LENG..... Médecine interne.
J. PACCALIN..... Thérapeutique, réanimation médicale, rééducation fonctionnelle et hydrologie.
J.-M. CAILLE..... Radiologie.
P. BESSE..... Cardiologie.
M. APARICIO..... Néphrologie.
Mme C. BEYLOT..... Dermato-Vénéréologie.
J.-M. GUILLARD..... Pédiatrie, génétique médicale.
J. PÉRISSAT..... Chirurgie générale.
D. LANGE..... Urologie.
F. COHADON ..... Neuro-chirurgie.
Mm M.-J. LE REBELLER.. Ophtalmologie.
F.-X. MICHELET..... Stomatologie.
J.-Cl. ROQUES ..... Biophysique.
A. CASSAIGNE..... Biochimie.
J. ROZIER..... Physiologie.
J. DANGOUMAU..... Pharmacologie.
J. TRIBOULEY..... Parasitologie.
G. DELMON..... Anatomie pathologique.

MAITRE DE CONFÉRENCES ASSOCIÉ

J. MOULINIER..... Hématologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

J.-P. CALAMEL..... Chirurgie générale.
L. TEXIER..... Dermato-syphiligraphie.
R. GENESTE..... Orthopédie.
F. FONTAN..... Chirurgie générale.
J. LASSERRE..... Orthopédie.

AGRÉGÉS LIBRES

G. FAUGÈRE..... Obstétrique.
M. L'ÉPÉE..... Médecine légale.
L. CORCELLE ..... Ophtalmologie.
M. PORTMANN..... Oto-rhino-laryngologie.
F. BALLANGER..... Urologie.

CHARGÉS DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFERENCES :

P. BONJEAN..... Anatomie.
M. LAHOURCADE..... Parasitologie.
M. SENTENAC..... Anatomie.
L. PINSON ..... Oto-rhino-laryngologie.
P. ESCHAPASSE ..... Physique médicale.

L'Attaché d'administration universitaire, Chef des services administratifs :

Madame M. C. CHAPENOIRE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1970 Thèse N° 279

Immunisation associée anti-tissulaire et anti-rhésus au cours des incompatibilités fœto-maternelles

Thèse pour le Doctorat en Médecine

présentée et soutenue publiquement
le Vendredi 27 Novembre 1970

par Marie-Claude MERLE
C.E.S. d'Immunologie et d'Hématologie
née le 19 Mai 1939 à RUFFEC (Charente)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. R. MAHON, Professeur . . . . . Président
M. J. BENTÉGEAT, Agrégé . . . . . Juges
M. C. MARTIN, Agrégé . . . . . Juges
M. J. MOULINIER, Maitre de Conférences Associé . . . . Juges

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél 91-12-59 —

A mes Parents

A Monsieur le Professeur L. MASSE

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire d'Immuno-Hématologie du Centre de Transfusion Sanguine de Bordeaux que vous dirigez. Vous nous avez permis d'effectuer ce travail.

Veuillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre respect.

Cette thèse est l'aboutissement d'un travail d'équipe.

Nous voulons exprimer notre gratitude à Monsieur F. MESNIER, Chef de Service au Centre de Transfusion Sanguine et nous tenons à remercier tout le personnel du Centre de Transfusion, et particulièrement Mademoiselle M.F. TEULIERE, pour l'aide qui nous a été apportée.

A Monsieur le Docteur J. MOULINIER

Maître de Conférences associé
Chef du Service d'Hématologie du Centre de Transfusion Sanguine de Bordeaux

Ce sujet vous intéressait particulièrement.

Vous nous l'avez confié, nous témoignant ainsi un intérêt dont nous sommes honorée.

Que cette thèse soit l'expression de notre profonde admiration et de notre respectueux attachement.

A NOS JUGES

Monsieur le Docteur J. MOULINIER

Maître de Conférences associé
Chef du Service d'Hématologie du Centre de Transfusion Sanguine de Bordeaux

Monsieur le Docteur C. MARTIN

Maître de Conférences agrégé de Pédiatrie
Médecin des Hôpitaux, Chef de Service

Monsieur le Docteur J. BENTEGEAT

Maître de Conférences agrégé d'Immunologie, Sérologie et Hématologie
Biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Croix de Guerre 1939-1945
Chevalier des Palmes académiques

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur R. MAHON

Professeur de Clinique d'accouchements
Gynécologue-accoucheur des Hôpitaux, Chef de Service
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier des Palmes académiques
Chevalier du Mérite social

Hommage respectueux

IMMUNISATION ASSOCIEE

ANTI-TISSULAIRE ET ANTI-RHESUS

AU COURS DES

INCOMPATIBILITES FOETO-MATERNELLES

P L A N

- INTRODUCTION .

- ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LES ANTI-CORPS ANTI-LEUCO-PLAQUETTAIRES CHEZ LA FEMME ENCEINTE .

- RECHERCHES PERSONNELLES .

- DISCUSSION .

- CONCLUSIONS .

- ANNEXES TECHNIQUES .

INTRODUCTION

Nous avons été amenés à nous intéresser à la recherche des anticorps d'Histocompatibilité dans le sérum des femmes immunisées anti-Rh parce que ces femmes représentent un excellent modèle d' incompatibilité fœto-maternelle .

Se trouvant déjà en réaction immunitaire à l'égard des antigènes érythrocytaires de leur enfant, on peut être assuré qu'elles ont subi un contact antigénique non pas limité aux hématies fœtales, mais probablement étendu aux autres éléments cellulaires du sang de leur enfant (leucocytes et plaquettes) .

Les leucocytes et les plaquettes portant les antigènes d'Histocompatibilité, on devait trouver chez ces femmes une plus grande fréquence d'anticorps anti-HL-A(x) par rapport aux femmes enceintes normales . Ce fut notre hypothèse de travail qui nous a conduit à faire le point de nos connaissances actuelles sur l'immunologie leuco-plaquettaire, puis à recueillir 150 observations personnelles de femmes immunisées anti-Rh, pour découvrir finalement une distinction sérologique très significative, entre les formes curables et les formes léthales de la maladie hémolytique péri-natale .

(x) *HL-A : "Human Leukocytes", premier système de groupe:"A".*

CHAPITRE I

ETAT ACTUEL DES CONNAISSANCES SUR LES ANTICORPS ANTI-LEUCO-PLAQUETTAIRES CHEZ LA FEMME ENCEINTE

I - METHODES DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-LEUCO-PLAQUETTAIRES .

II - 1954-1964 : PREMIERE ETAPE DES CONNAISSANCES SUR LES ANTICORPS ANTI-LEUCO-PLAQUETTAIRES CHEZ LA FEMME ENCEINTE .

III - 1965-1970 : DEUXIEME ETAPE DE NOS CONNAISSANCES SUR LES ANTICORPS ANTI-LEUCO-PLAQUETTAIRES CHEZ LA FEMME ENCEINTE .

L'immunisation fœto-maternelle anti-leuco-plaquettaire a été suggérée dès 1954 par J. DAUSSET , et en 1956 par WHYTE et JEE .

Ces auteurs ont pensé que des anticorps anti-leucocytaires devaient se former sous l'effet d'une stimulation maternelle par les antigènes leuco-plaquettaires du fœtus, hérités du père et manquant à la mère .

La preuve de cette allo-immunisation allait en être apportée grâce au développement des techniques d'identification des anticorps anti-leucocytaires et anti-plaquettaires .

I - METHODE DE DETECTION DES ANTICORPS ANTI-LEUCO-PLAQUETTAIRES .

Les anticorps anti-leuco-plaquettaires possèdent les caractères généraux de tous les anticorps sériques . En effet, ce sont des Immunoglobulines classées en deux groupes : les IgM et les IgG, différant principalement par leur poids moléculaire et le fait que ces dernières seulement traversent la barrière placentaire .

Chaque type d'immunoglobuline possède une méthode de détection qui lui est propre, et il a été successivement mis au point les techniques suivantes :

- la leucoagglutination (DAUSSET : 1954)
  Elle est basée sur le pouvoir de certains sérums d'agglutiner une suspension leucocytaire . Elle révèle les IgM .

- la Consommation d'antiglobuline (MOULINIER : 1955)
  Les leucocytes sensibilisés par un anticorps sont capables de fixer l'antiglobuline, ce qui est mis en évidence par la mesure du titre antiglobulinique du réactif de Coombs, avant et après contact avec ces leucocytes . Elle révèle les IgG .

- la Fixation du Complément (SHULMAN : 1964)
  Elle est basée sur la capacité que présentent certains complexes antigènes-anticorps de fixer le Complément . Elle révèle les anticorps fixant le Complément.

- la Lymphocytotoxicité (TERASAKI : 1964)
  Son principe utilise la propriété de l'anticorps d'altérer la paroi du lymphocyte porteur de l'antigène correspondant, et de visualiser le phénomène par l'emploi d'un colorant vital . Elle révèle les IgG .

Ainsi l'amélioration progressive des techniques immunologiques permit de mieux cerner le problème de l'immunisation fœto-maternelle anti-leuco-plaquettaire, et nos connaissances sur les anticorps anti-leuco-plaquettaires de la femme enceinte se sont développées en deux étapes :

- première étape elle est due à l'application des premières méthodes sérologiques (leuco-agglutination et consommation d'antiglobuline) .

- deuxième étape : elle correspond à l'utilisation des techniques de Fixation du Complément (sur plaquettes) et de lymphocytotoxicité . Ce sont les méthodes sérologiques à partir desquelles sont maintenant reconnus et identifiés les antigènes d' Histocompatibilité composant le "Système HL-A" .

II - 1954-1964 : PREMIERE ETAPE DES CONNAISSANCES SUR LES ANTICORPS ANTI-LEUCO-PLAQUETTAIRES CHEZ LA FEMME ENCEINTE .

L'évidence du passage transplacentaire des globules rouges fœtaux vers la mère pendant la grossesse et l'accouchement est à cette époque bien établie . Des hématies fœtales ont été démontrées dans la circulation maternelle (CHOWN 1954, CREGER et STEELE 1957, ZIPURSKY 1959) . Comme résultat du passage des globules rouges dans le sang maternel, une immunisation peut survenir si une incompatibilité existe entre mère et enfant . L'incompatibilité Rhésus en fournit l'exemple le plus commun, et le seul connu pendant longtemps .

Non seulement les globules rouges, mais aussi les leucocytes et les plaquettes traversent le placenta . Une preuve indirecte de ce passage fœto-maternel des leucocytes et des plaquettes fut obtenue par la découverte d'anticorps anti-leucocytaires dans le sang maternel .

En 1958, VAN ROOD et coll., d'une part, et R. PAYNE (1958) d'autre part, mirent en évidence des anticorps anti-leucocytaires dans le sérum des mères jamais transfusées, mais ayant eu plusieurs grossesses . Les anticorps réagissaient avec les leucocytes du mari et ceux de certains enfants . Ces anticorps présents chez la mère se trouvaient être dirigés contre les antigènes leucocytaires de l'enfant .

III - 1965-1970 : DEUXIEME ETAPE DE NOS CONNAISSANCES SUR LES ANTICORPS ANTI-LEUCO-PLAQUETTAIRES CHEZ LA FEMME ENCEINTE .

Des progrès importants furent apportés un peu plus tard par des auteurs hollandais : en 1965 par Chr. Van DER WEERDT, et en 1966 par ENGELFRIET .

Chr. Van DER WEERDT travailla sur les plaquettes . Elle examina des sérums de femmes multipares (trois grossesses ou plus) pour leur activité anti-plaquettaire par la méthode de Fixation du Complément . Ces sérums furent pris au huitième mois de grossesse et examinés de telle sorte que les anticorps faibles ne devaient pas être trouvés, car son travail était d'obtenir des anti-sérums valables pour des études de spécificité . Aussi trouva-t-elle des pourcentages de sérums positifs inférieurs à ceux rapportés par d'autres auteurs employant la même méthode (DIAMOND et KLIMAN 1964, DAUSSET et TANGUN 1964) .

A côté de cette série de sérums de femmes multipares normales, elle examina des échantillons de sérums de femmes enceintes Rhésus négatif immunisées anti-Rhésus . Sur 302 sérums provenant de femmes enceintes ayant des anticorps anti-Rh, quatre seulement possédaient des anticorps anti-plaquettaires . Cette basse fréquence (1, 39%) est analogue à celle que l'on observe chez les femmes multipares sans immunisation anti-Rh par cette technique de Fixation du Complément (1%) .

ENGELFRIET, en 1966, fit une étude approfondie sur l'Immunologie leucocytaire . Il démontra que le sérum des femmes ayant eu des grossesses exerçait un

effet cytotoxique sur les leucocytes . Il concluait donc à la présence d'anticorps cytotoxiques démontrés par les faits suivants :

- le Facteur cytotoxique est résistant à 56° pendant 30 minutes ,
- il est détruit par le chauffage à 70° pendant 10 minutes il n'est actif qu'en présence de Complément,
- il peut être absorbé spécifiquement avec les leucocytes réagissant positivement ,
- il est localisé dans la fraction IgG des globulines du sérum .

Après ces résultats, il étudia , d'une part, la relation de ces anticorps avec les anticorps agglutinants, et fixant le Complément, et d'autre part, leur spécificité cellulaire :

- Les anticorps anti-leucocytaires cytotoxiques sont différents des anticorps agglutinants, mais les anticorps fixant le Complément et les anticorps cytotoxiques sont probablement identiques . De plus, ces anticorps cytotoxiques sont dirigés contre les antigènes spécifiques des granulocytes, des lymphocytes et contre les antigènes communs aux deux cellules . Pour ces recherches,les sérums, adressés à titre de dépistage prénatal, provenaient de femmes Rhésus négatif au 8ème mois de grossesse : 333 sérums furent examinés avec du Complément humain . Des anticorps cytotoxiques furent trouvés dans 84, soit 27% de ces sérums . Ce pourcentage est beaucoup plus fort que celui trouvé par le même auteur en examinant 838 sérums de la même source mais par leucoagglutination (ENGELFRIET 1961) .

Ces résultats furent confirmés par JENSEN (1962-1964) qui montra d'autre part que la fréquence des leucoagglutinines dans le sérum a été trouvée augmentée parmi les femmes présentant des anticorps anti-érythrocytaires .

ENGELFRIET étudia de plus la corrélation entre le nombre de grossesses et le pourcentage de sérums positifs . Il en conclut qu'il n'y a pas de différence significative entre les primipares et les multipares. La fréquence

de l'immunisation anti-leucoplaquettaire est cependant, sur les petites séries étudiées, un peu plus élevée chez les multipares (26% contre 21,5% chez les primipares).

- Les leucoagglutinines, au contraire, rarement trouvées à la première grossesse, augmentent ensuite (Van ROOD: 1959, R. PAYNE :1962, JENSEN : 1964) . Le pourcentage de sérums positifs, dans l'étude de JENSEN, était de 16% chez les multipares contre 2% chez les primipares .

ENGELFRIET déduit de ces études que les anticorps cytotoxiques sont formés beaucoup plus fréquemment qu'aucun autre type d'anticorps , et formés beaucoup plus vite, ces anticorps n'augmentent pas après la première grossesse, car toutes les femmes qui doivent les fabriquer le font tout de suite .

- ENGELFRIET et OVERWEG (1969) complétèrent et confirmèrent ce travail en étudiant le sérum de 166 femmes à différents stades, pendant et après la première grossesse . Des anticorps cytotoxiques furent trouvés dans 15 sérums dont 11 fois dès la vingt-quatrième semaine de gestation . Ces anticorps examinés au point de vue immunologique , même les premiers détectés, s'avèrent être des IgG (et non des IgM) .

Grâce à ces connaissances sur les anticorps anti-leuco-plaquettaires chez la femme enceinte, certaines situations pathologiques, gravidiques et néo-natales, ont été étudiées par différents auteurs, en fonction de l'incompatibilité leucocytaire entre la mère et son enfant . Ce sont : la Stérilité, les Avortement spontanés, et les Neutropénies néo-natales .

1°- Stérilité .

Aucune étude n'a été faite qui permette de conclure à la responsabilité des anticorps d' histocompatibilité dans certains cas de stérilité . Récemment, il a été montré que les haplotypes HL-A s'exprimaient au niveau des spermatozoïdes et l'hypothèse d'une sélection naturelle fondée sur l'Histocompatibilité mériterait d'être étudiée .

2°- Avortements spontanés .

Aucune corrélation n'a été observée par JENSEN entre la fréquence des avortements et la présence de leuco-agglutinines dans le sérum maternel . Ces résultats rejoignent les constatations de Van ROOD .

3°- Les Neutropénies néo-natales.

Très peu d'observations ont été rapportées de cette affection rare . Il semblerait qu'elle échappe au cadre de l'incompatibilité dans le système HL-A, mais qu'elle relève, plutôt, d'un problème d'incompatibilité de groupes propres aux granulocytes . LALEZARI, en effet, a isolé dans le sérum des mères des enfants atteints de neutropénie néo-natale, un anticorps 7 S spécifiquement antigranulocytaire .

°°°

Finalement, aucune étude n'a été tentée pour reconnaître une éventuelle atteinte viscérale du fœtus ; or, les antigènes du système HL-A étant des antigènes tissulaires, il était logique d'émettre l'hypothèse d'une atteinte viscérale du fœtus par les anticorps maternels anti HL-A . Tel fut l'objectif de nos recherches .

CHAPITRE II

RECHERCHES PERSONNELLES

I - ORIENTATION DE NOS RECHERCHES .

II - ORIGINE DES SERUMS .

III - METHODES .

IV - EXPRESSION DES RESULTATS .

V - SYNTHESE DES RESULTATS .

I - ORIENTATION DE NOS RECHERCHES PERSONNELLES .

L'hypothèse d'une atteinte tissulaire du fœtus au cours de l'incompatibilité fœto-maternelle Rhésus avait été suggérée par J. MOULINIER dès 1952 . Aucune preuve n'en avait jamais pu être apportée , bien que la constatation d'une thrombopénie fréquemment associée à l'anémie dans les formes graves de maladie hémolytique néo-natale suggérait la possibilité d'une atteinte des autres cellules sanguines en dehors des érythrocytes .

C'est au cours d'une recherche systématique d'anticorps anti-plaquettaires dans le sérum des femmes immunisées anti Rh, destinée à élucider le problème pathogénique de cette thrombopénie des nouveau-nés atteints de maladie hémolytique Rhésus, que nous avons constaté que ces anticorps n'étaient pas seulement anti-plaquettaires, mais anti-leuco-plaquettaires .

Or, les antigènes communs aux leucocytes et aux plaquettes sont des antigènes d'Histocompatibilité appartenant au système HL-A .

Les anticorps qui les révèlent sont actifs sur les plaquettes (par réaction de Fixation du Complément) et sur les lymphocytes (par le test de lymphocytotoxicité). Ce sont des anticorps cytotoxiques .

C'est ainsi que nos recherches se sont orientées vers ces anticorps cytotoxiques dans le sérum des femmes immunisées anti-Rh .

II - ORIGINE DES SERUMS .

De 1967 à 1970, nous avons pu étudier au Laboratoire d'Histocompatibilité du Centre de Transfusion Sanguine de Bordeaux, 150 sérums de femmes immunisées anti-Rh .

La majorité de ces sérums (126) provenaient du Laboratoire du Rh du Centre de Transfusion Sanguine de Bordeaux, où ils avaient été adressés à titre de dépistage prénatal .

Un certain nombre de sérums pathologiques (24) nous ont été, en outre, confiés par le Laboratoire du Centre de Transfusion Sanguine de Toulouse (Pr. Agrégé BIERME et Mme le Dr. BIERME) .

III - METHODES .

1°- L'étude des anticorps anti-érythrocytaires (anti-Rh) - recherche, spécificité et titrage, a été effectuée par les méthodes immuno-hématologiques habituelles :

- épreuves aux enzymes protéolytiques (tests sur hématies traitées par la papaïne)
- épreuve à l'antiglobuline (Test indirect de Coombs) .

2°- L'étude des anticorps anti-leucoplaquettaires a été effectuée par la réaction de Fixation du Complément sur une gamme de plaquettes témoins (au minimum 20 échantillons) . La technique employée a été celle de Shulman modifiée par Colombani (Annexe I) .

3°- L'étude des anticorps cytotoxiques a été réalisée :

- soit par une épreuve directe sur les lymphocytes du mari ,
- soit sur des lymphocytes-témoins d'un "panel" comportant de 20 à 80 échantillons cellulaires, couvrant tous les antigènes connus .

Les tests ont été exécutés selon la micro-méthode de Térasaki (Annexe 2) .

Un certain nombre d'observations ont pu être étudiées d'une façon complète avec le groupage HL-A : de la mère, du père, et parfois des enfants .

4°- Définition du titre :

La détermination du titre en anticorps des sérums a été effectuée par dilutions successives en progression géométrique de raison 2 .

Son expression a été définie par le titre de la dilution dans le dernier mélange, donnant une réaction positive .

La méthode employée fut celle de Térasaki .

5°- Définition de la spécificité :

La spécificité qui est la reconnaissance de l'anticorps par son "antigène" spécifique a été effectuée avec un panel couvrant tous les antigènes connus du système HL-A .

IV - EXPRESSION DES RESULTATS .

. Les résultats sont présentés dans les tableaux I et II .

. Les sérums ont été classés en deux groupes selon les antécédents obstétricaux .

1er groupe "Formes curables" .

Les enfants ont présenté une forme curable de maladie hémolytique Rhésus :

- Ictère hémolytique néo-natal n'ayant pas nécessité d'exsanguino-transfusion .
- Ictère grave traité et guéri, sans séquelles, par exsanguino-transfusion .

2ème groupe "Formes léthales"

Ici, la gravité est basée sur la connaissance d'une atteinte sévère du fœtus ou du nouveau-né :

- Anasarque fœto-placentaire,
- Mort intra-utérine,
- Enfant atteint d'Ictère grave et décédé malgré l'exsanguino-transfusion ,
- Atteintes fœtales gravissimes ayant nécessité des transfusions intra-utérines ,
- Enfant atteint d'ictère nucléaire .

Ces accidents graves peuvent alterner éventuellement, dans une même fratrie, avec des enfants atteints d'Ictère hémolytique néo-natal, traités et guéris par exsanguino-transfusion (formes curables) .

Chaque tableau résume :

- les caractères immuno-hématologiques et
- l'histoire obstétricale .

1°- Caractères immuno-hématologiques :

- Anticorps anti-Rh : dans cette rubrique sont mentionnés :

. la spécificité de ces anticorps ,
. le titre (en papaïne) .

- Anticorps cytotoxiques : étudiés par lymphocytotoxicité (LCT) microméthode (Annexe 2) .

Sont donnés ici :

. les réactions positives et négatives ,
. le titre .

- Anticorps anti-leuco-plaquettaires : mis en évidence par la réaction de Fixation du Complément (RFC') - (Annexe 1) .

Dans cette colonne, ne sont marquées que les réactions positives ou négatives .

2°- Histoire obstétricale :

Les chiffres romains : I, II, III, etc .. représentent les grossesses successives des femmes immunisées anti-Rh .

- V. B. P. : signifie les enfants non atteints de maladie hémolytique, vivants, bien portants à la naissance, qu'ils soient Rh négatif ou Rh positif, dont le test direct de Coombs est négatif .

- I. G. : "Ictère grave" correspondant à la forme curable de la maladie hémolytique .

- I. G. † : Enfants décédés d'Ictère hémolytique malgré l'exsanguino-transfusion .

- F. C. : "Fausse-couche" ou Avortement : interruption de la grossesse, avant le 6ème mois .

- M. I. U. : Mort du fœtus in utero après le 6ème mois.

- T. I. U. : Transfusion intra-utérine .

- I. N. : Ictère nucléaire .

TABLEAU I

FORMES CURABLES

N°	AC anti-Rh		L C T		RFC'	Histoire obstétricale					
	Spéc.	Titre	R	Titre		I	II	III	IV	V	VI et +
1	- C + D	4/32	-		-	IG	IG				
2	- C + D	16/256	-			VBP	IG				
3	- C + D	8/32	-			VBP	IG	VBP			
4	- D	1024	-		-	VBP	IG				
5	- D	4	-		-	VBP	VBP	VBP			
6	- D	32	-			VBP	VBP	IG			
7	- D + C	32	-			VBP	VBP	VBP	VBP	IG	
8	- D	512	-			VBP	VBP	VBP	VBP	VBP	IG/IG /IG
9	- D	32	-			VBP	IG				
10	- D	128	-			FC	FC	VBP	IG		
11	- D	128	-		-	VBP	VBP	IG	VBP	VBP	VBP /IG
12	- D	64	-			VBP	VBP	VBP	IG	FC	IG
13	- D	16	-			VBP	VBP	FC	IG		
14	- D	256	-		-	VBP	IG	IG			
15	- D	128	+		-	IG					
16	- D	64	+		-	FC	IG	VBP			
17	- D	4	-		-	FC	VBP				
18	- D	256	+			VBP	VBP	VBP			
19	- D	256	+			VBP	VBP	VBP	FC		
20	- D	32	-		-	VBP	IG				
21	- D	64	-		-	VBP	IG	IG	IG	IG	
22	- D	128	-		-	VBP	IG				
23	- D	32	-		-	VBP	VBP	IG			
24	- D	512	-		-	VBP	IG				

N°	AC anti-Rh		L C T		RFC'	Histoire obstétricale					
	Spéc.	Titre	R	Titre		I	II	III	IV	V	VI et +
25	- D	256	-		-	IG	IG	IG			
26	- D	16	-		-	VBP	VBP	IG			
27	- D	64	-		-	VBP	IG	IG			
28	- D	64	-		-	VBP	VBP	VBP	IG	IG	
29	- D + C	512	-		-	VBP	IG				
30	- D + C	256	-		-	VBP	IG				
31	- D	16	-			VBP	IG				
32	- D	32	-			VBP	VBP	VBP	IG		
33	- D	64	-			VBP	IG	IG	IG	IG	
34	- D + C	256	-		+	VBP	VBP	IG			
35	- D	32	+		-	VBP	IG				
36	- D	8	-		-	IG	VBP				
37	- D	64	+		-	VBP	IG	FC	IG	IG	
38	- D	64	-		-	VBP	IG	IG	IG	IG	IG/FC /IG
39	- D	512	+		-	VBP	VBP	VBP	IG	FC	IG/IG
40	- D	512	-		-	FC	VBP	IG			
41	- D	128	+	1/8	-	VBP	VBP	VBP	IG		
42	- D	64	-		-	VBP	IG				
43	- D + C	64	-		-	VBP	IG				
44	- D + C	256	-		-	VBP	IG				
45	- D	2	-		-	VBP					
46	- D	512	+	1/8	-	IG	IG				
47	- D	64	-		-	VBP	VBP	VBP	1 VBP	2 IG	
48	- D	128	-		-	VBP	IG				
49	- D	128	-		-	VBP	IG	IG			
50	- D	32	+		-	VBP	IG				

N°	AC anti-Rh		L C T		RFC'	Histoire obstétricale					
	Spéc.	Titre	R	Titre		I	II	III	IV	V	VI et +
51	- D	4	-		-	VBP	VBP				
52	- D	32	-		-	IG					
53	$\bar{c}$ + E	64+64	-		-	VBP	VBP	VBP	IG	IG	VBP/VBP
54	- D	16	-		-	VBP	VBP	FC	FC	VBP	
55	- D	128	-		-	FC	FC	VBP	VBP	IG	
56	- $\bar{c}$	8	+		-	FC	VBP	VBP	VBP	VBP	VBP/FC VBP/FC
57	- D	32	+	1/32	+	VBP	VBP				
58	- D	256	-		-	VBP	IG				
59	- D + C	64	-		+	VBP	IG				
60	- D + C	128	-		+	VBP	IG				
61	- D	32	-		-	VBP	IG				
62	- D	64	-		-	VBP	IG				
63	- D	512	-		-	VBP	VBP	VBP	IG		
64	- D	32	-		-	VBP	IG				
65	- D	32	-		-	VBP	IG				
66	- D	16	-		-	VBP	IG				
67	- D	64	-		-	VBP	IG				
68	- D	32	-		-	VBP	IG				
69	- D	16	-		-	VBP	IG				
70	- D	16	-		-	VBP	IG				
71	- D	128	-		-	VBP	VBP	IG	IG		
72	- D	64	-		-	VBP	IG				
73	- D	8	-		-	VBP	VBP	VBP	VBP	VBP	VBP/VBP
74	- D	16	-		-	FC	VBP	VBP	VBP	VBP	FC /VBP
75	- D	32	-		-	VBP	IG				
76	- D	16	+	1/8	+	VBP	VBP	VBP	VBP	FC	IG/IG/IG

TABLEAU II

FORMES LETHALES

N°	AC anti-Rh		L C T		RFC'	Histoire obstétricale					
	Spéc.	Titre	R	Titre		I	II	III	IV	V	VI et +
1	- D	256	+	1/8	-	VBP	MIV	FC	IG†	VBP	IG
2	- D	128	+		-	VBP	MIV	VBP	FC		
3	- D	1 000	+		-	VBP	VBP	IG	IG	MIV	MIV/MIV/MIV
4	- D	128	-		+	VBP	VBP	VBP	VBP	VBP	MIV/MIV/IG† /MIV
5	- D	1 024	+		-	VBP	FC	FC	VBP	MIV	MIV/MIV
6	- D	128	-		-	VBP	IG†	VBP	VBP	VBP	
7	- D	256	-		-	VBP	IG†	IG			
8	- D	256	-		-	VBP	IN				
9	- D	512	-		-	MIV	MIV	MIV	IG	IG	
10	- D	512	-		-	VBP	MIV	MIV			
11	- D	512	-		-	VBP	IG	IG	IG	IG†	IG†
12	- D	128	-		-	VBP	IG	IG	IG	IG	IG†
13	- D + C	128	+		-	FC	VBP	IG†	IG		
14	- D + E	64	+		-	VBP	IG	MIV	FC	VBP	MIV/MIV/IG/IG
15	- D	64	-		-	VBP	MIV				
16	- D + C	512	-		+	VBP	IG†				
17	- D	512			-	VBP	IG†	FC	FC		
18	- D	256			-	VBP	VBP	MIV			
19	- D	512			-	VBP	IG†	IG			
20	- D	2 000	-		+	VBP	MIV	MIV			
21	- D	1 024			-	VBP	MIV	MIV			
22	- D	256	+		-	VBP	IG	IG	IG†	IG†	
23	- D	256	+	1/64	+	FC	VBP	VBP	MIV	IG	VBP/VBP/IG
24	- D	128	+	1/4	+	FC	VBP	IG†			
25	- D	128	+		-	VBP	MIV	MIV	IG		
26	- D	64	+	1/16	+	VBP	FC	IG†			

N°	AC anti-Rh		L C T		RFC'	Histoire obstétricale					
	Spéc.	Titre	R	Titre		I	II	III	IV	V	VI et +
27	- D + C	512	+	1/32	+	FC	IG†	MIV			
28	- D + E	4 000	+			VBP	MIV	MIV	MIV	MIV	
29	- D + E	1 024	+	1/4	+	VBP	VBP	FC	FC	IG	FC/VBP
30	- D	512	+	1/32	-	VBP	MIV	IG	IG		
31	- D + C	256	-		+	VBP	VBP	VBP	VBP	VBP	MIV/MIV/IG
32	- D	128	-		-	IG	MIV				
33	- D	64	-		-	VBP	MIV				
34	- D	1 024	-		-	VBP	IG†	IG†	IG	VBP	MIV/IG/FC/MIV
35	- E	16	+	1/4	+	VBP	VBP	MIV	VBP		
36	- D	64	+	1/4	+	VBP	IG†				
37	- D	128	(+)		+	VBP	FC	VBP	TIV		
38	- D	1 024	+	1/4	-	VBP	VBP	IG			
39	- D	512	+	1/32	(+)	VBP	IG	IG†			
40	- D	16	+	1/8	-	VBP	VBP	MIV	IG		
41	- D	128	+	1/8	+	VBP	VBP	VBP	MIV		
42	- D + C	128	-		-	MIV	MIV	MIV	MIV		
43	- D	32	+	1/8	+	VBP	VBP	IG†			
44	- D	32	+	1/4	+	MIV	MIV	MIV	MIV	IG†	
45	- D	32	+		+	MIV	IG	VBP	IG		
46	- D	64	-		-	VBP	IG†				
47	- D	128	+	1/2	-	VBP	MIV				
48	- D	64	+	1/8		VBP	IG†				
49	- D	256	-		+	VBP	MIV	MIV	MIV		
50	- D	512	+	1/4	+	IG	TIV				

N°	AC anti-Rh		L C T		RFC'	Histoire obstétricale					
	Spéc.	Titre	R	Titre		I	II	III	IV	V	VI et +
1		-	-		+	VBP	VBP	VBP	MIV		
2		512	+		+	VBP	MIV				
3		2 000	+		+	VBP	VBP	MIV			
4		1 024	+		+	MIV	MIV	MIV	MIV	IG†	IG†
5		256	-		+	MIV	MIV	MIV			
6		256	-		-	VBP	MIV				
7		-	-		-	VBP	MIV				
8		-	-		-	VBP	VBP	MIV			
9		-	-		-	MIV					
10		-	+		+	VBP	MIV	MIV			
11		-	-		-	VBP	MIV				
12		-	+		+	VBP	VBP	MIV	MIV		
13		64	-		-	MIV	IG†				
14		512	+		-	VBP	MIV	MIV	IG†		
15		32	+	1/4	+	VBP	MIV	IG†			
16		64	+	1/2	-	VBP	VBP	MIV	IG†		
17		-	-		-	VBP	MIV	IG†			
18		128	+	1/2	-	VBP	VBP	MIV	MIV	MIV	MIV/MIV
19		256	-		-	VBP	MIV	MIV			
20		-	+		-	VBP	VBP	MIV			
21		-	-		-	VBP	VBP	MIV	MIV		
22		64	+		-	VBP	VBP	MIV	MIV		
23		16	+	1/2	+	VBP	MIV				
24		32	+		+	VBP	MIV				

V - SYNTHESE DES RESULTATS .

Par la méthode de lymphocytotoxicité:

- 1er groupe : Dans les Formes Curables de la maladie hémolytique néo-natale (76 cas), les anticorps cytotoxiques sont trouvés dans 13 sérums maternels, soit 17%: c'est la fréquence habituelle des immunisations maternelles anti-leuco-plaquettaires .

- 2ème groupe : Dans les Formes Léthales (74 cas), 41 sérums maternels, soit 55,4 % possèdent des anticorps cytotoxiques .

Par la méthode de Fixation du Complément :

- 1er groupe : dans les Formes Curables : 5 sérums présentent des anticorps fixant le Complément sur 62 testés, soit 7,9 % .

- 2ème groupe : Dans les Formes Léthales, 29 sérums sur 72 possèdent des anticorps , soit 40,27 % .

Ces résultats sont exprimés dans les tableaux III et IV .

	Nombre de sérums étudiés	*Nombre de sérums possédant un anticorps cytotoxique*	*Pourcentage*
Formes curables	76	13	17 %
Formes léthales	74	41	55,4 %

Tableau III - Anticorps cytotoxiques dans le sérum de 150 femmes immunisées anti-Rh.

	Nombre de sérums étudiés	*Nombre de sérums possédant un anticorps fixant le complément*	*Pourcentage*
Formes curables	62	5	7,9 %
Formes léthales	72	29	40,27 %

Tableau IV - Anticorps fixant le complément dans le sérum de 134 femmes immunisées anti-Rh.

CHAPITRE III

DISCUSSION

I - INTRODUCTION .

II - MECANISME DE L'IMMUNISATION ANTI-LEUCO-PLAQUETTAIRE :

- grossesse normale,
- grossesse "pathologique" .

III - ROLE DE L'ANTICORPS CYTOTOXIQUE :

A- Caractères sérologiques de l'anticorps anti-tissulaire chez la femme enceinte .
1 - titre
2 - spécificité
3 - comparaison avec l'anticorps fixant le Complément
4 - comparaison avec l'anticorps anti-Rh .

B- Signification de l'anticorps cytotoxique :
. simple curiosité sérologique
. facteur sérologique aggravant .

IV - PERSPECTIVES D'APPLICATION THERAPEUTIQUE:

- Gamma-globuline anti HL-A .

I - INTRODUCTION .

Les résultats que nous venons d'exposer dans le deuxième chapitre, montrent une différence significative de la fréquence de l'Immunisation anti-leuco-plaquettaire selon l'état de gravité de la maladie hémolytique Rh.

- Lorsqu'il s'agit d'une forme curable de la maladie hémolytique, 17% des mères de ces enfants ont dans leur sérum , en plus de l'anticorps anti-Rh, un anticorps cytotoxique : c'est la fréquence habituelle de présence d'un anticorps anti-HL-A chez toutes les femmes enceintes ou accouchées .

- Mais, lorsqu'il s'agit de la forme léthale de maladie hémolytique, 55,4% de mères ont une immunisation anti-tissulaire en plus de l'immunisation anti-Rh : c'est une fréquence trois fois plus élevée .

II - MECANISME DE L'IMMUNISATION ANTI-HL-A :

1°- Grossesses normales :

On peut expliquer cette immunisation par trois mécanismes physio-pathologiques, agissant indépendamment ou peut-être, successivement :

a) Le passage transplacentaire de sang fœtal dans la circulation maternelle peut être la cause d'une sensibilisation HL-A, du fait de l'introduction, dans l'organisme de la mère, de cellules portant des antigènes tissulaires (leucocytes, plaquettes) (DESAI, 1966) .

b) La migration des lymphocytes fœtaux se produit à travers le placenta . Ceux-ci ont été trouvés dans la circulation maternelle où ils ont été reconnus grâce à un marqueur naturel, le chromosome "Y" lorsque l'enfant est du sexe masculin (J. WALKNOWSKA, 1969) .

c) La présence d'antigènes HL-A sur les cellules du trophoblaste (KIRBY , 1969), jouerait, peut-être, un rôle non négligeable dans l'immunisation anti-HL-A . En effet, il a été démontré que ces cellules peuvent pénétrer dans la circulation maternelle (HAMILTON et BOYD , 1966) .

Ces trois modes de sensibilisation permettent de comprendre la grande fréquence d'immunisation anti-HL-A déjà observée dès la première grossesse . La migration des leucocytes du fœtus, phénomène presque constant au cours de toute grossesse, provoquerait l'état de

"sensibilisation primaire" de la femme primigeste , et les saignements transplacentaires du dernier trimestre de la gestation déclencheraient la production des anticorps cytotoxiques .

2°- Grossesses "pathologiques"

Dans le cas d'un conflit fœto-maternel anti-Rh, un mécanisme particulier d'immunisation anti-tissulaire doit être invoqué .

Trois explications peuvent être avancées :

a) La femme immunisée anti-Rh est un "bon producteur d'anticorps" . Elle représente déjà la sélection de 7 à 10% de femmes Rh négatif capables de faire des anticorps anti-Rh en réponse à une sollicitation antigénique de leur fœtus . Elle fait ainsi la preuve de sa capacité de réponse immunitaire .

Cependant, si cette hypothèse était exacte, la fréquence de l'immunisation anti-HL-A devrait être supérieure à 20% pour toutes les femmes immunisées anti-Rh, quelle que soit la forme clinique de la maladie Rh de leur fœtus .

b) Des lésions placentaires propres à la maladie hémolytique Rh pourraient favoriser la sensibilisation anti-tissulaire . En réalité , ces lésions placentaires n'ont jamais été clairement démontrées . Toutefois, on peut imaginer que, lorsque le fœtus meurt in utero, du "matériel antigénique" est susceptible de passer dans la circulation maternelle au cours de la rétention plus ou moins prolongée de l'œuf mort . Cette explication n' est pas entièrement satisfaisante car, dans un grand nombre de nos observations personnelles concernant les formes léthales de maladie hémolytique, l'anticorps cytotoxique a été trouvé dans le sérum maternel avant la mort du fœtus .

c) Les cellules immatures de la lignée érythrocytaire, pourraient provoquer l'immunisation maternelle anti-HL-A .

HARRIS et coll. (1969) ont montré que les réticulocytes et probablement les érythroblastes portaient les antigènes d'Histocompatibilité . D'où l'hypothèse très séduisante du mécanisme de l'immunisation mixte anti-Rh et anti-HL-A que l'on peut schématiser en trois temps (tableau V) .

- 1er temps : le passage transplacentaire du sang fœtal provoque l'immunisation anti-Rh chez la mère .

- 2ème temps : le passage de l'anticorps anti-Rh dans la circulation fœtale provoque une hyperhémolyse , ce qui entraîne une intense réaction réticulocytaire et érythroblastique .

- 3ème temps : les passages transplacentaires de sang fœtal introduisent alors dans la circulation maternelle des quantités importantes de cellules portant les antigènes d'Histocompatibilité (réticulocytes et érythroblastes) et provoquent le développement des anticorps anti-leuco-plaquettaires .

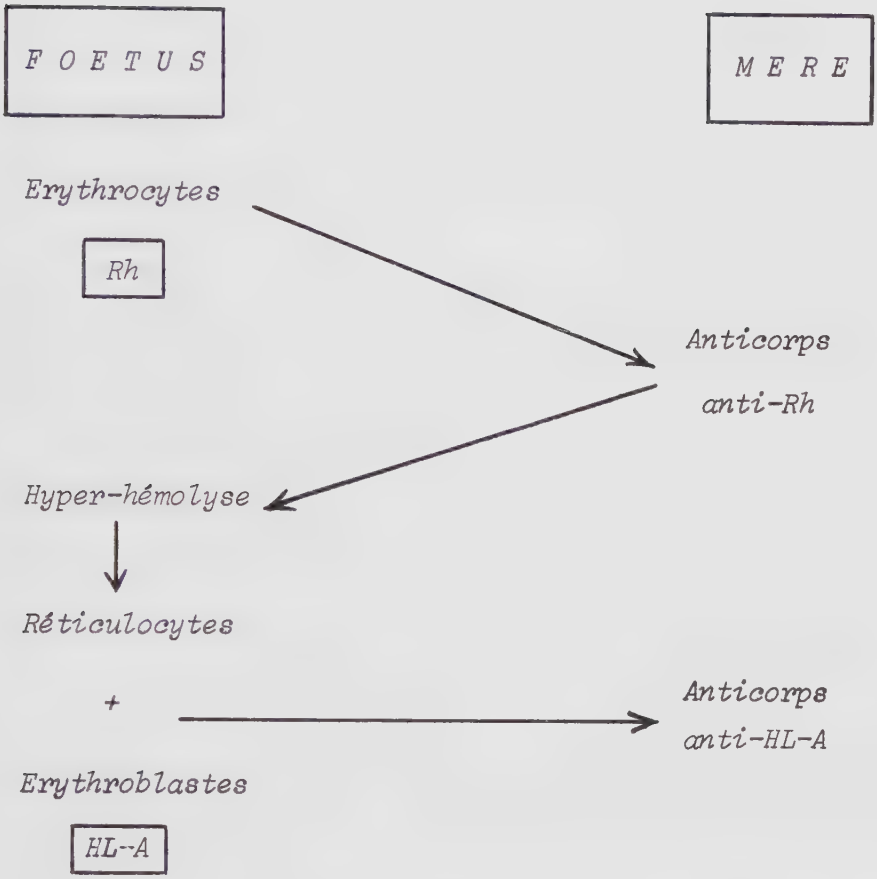


Tableau V

L'immunisation mixte anti-Rh - anti HL-A

III - ROLE DE L'ANTICORPS CYTOTOXIQUE .

A/ CARACTERES SEROLOGIQUES DE L'ANTICORPS ANTI-TISSULAIRE CHEZ LA FEMME ENCEINTE.

Pour préciser le rôle de ces anticorps cytotoxiques trouvés dans le sérum des femmes immunisées anti-Rh, nous avons essayé d'en déterminer les caractères sérologiques . Pour cela, nous avons étudié :

1°- Les rapports existant entre les antécédents cliniques et les deux paramètres sérologiques suivants :

a) Le titre de l'anticorps anti-HL-A ,
b) La spécificité de l'anticorps anti-HL-A .

2°- Les rapports existant entre l'anticorps fixant le Complément et l'anticorps cytotoxique en fonction de l'histoire clinique .

3°- Les rapports existant entre ces mêmes antécédents cliniques et le titre de l'anticorps anti-Rh comparé à la présence ou à l'absence de l'anticorps anti-HL-A .

1°- Rapports entre les antécédents cliniques et l'anticorps anti-HL-A (titre, spécificité) .

a) Titre de l'anticorps anti-HL-A .

Nous avons pu titrer les anticorps anti HL-A dans 26 sérums positifs comprenant :

. 4 cas de Formes Curables et
. 22 cas de Formes Léthales .

La plupart de ces sérums possédaient des anticorps d'un titre très faible (1/2, 1/4, 1/8ème); et seulement six d'entre eux avaient une concentration en anticorps supérieure à 1/16ème (entre 1/16ème et 1/64ème).

Ces résultats sont donnés dans le tableau VI .

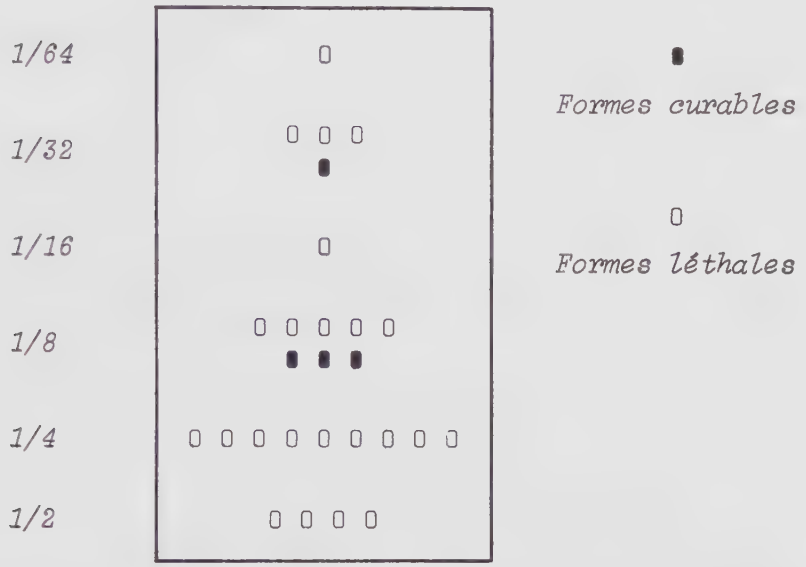


Tableau VI - Titre des anticorps anti-HL-A dans 26 sérums positifs étudiés.

Il n'a pas été observé de différence significative du titre en anticorps des sérums pathologiques entre les formes curables et les formes léthales de la Maladie hémolytique . D'ailleurs, cette échelle de titre entre 1/2 et 1/64 correspond à celle que l'on observe communément au cours des immunisations anti-HL-A des sujets polytransfusés ou des femmes enceintes sans antécédents cliniques .

b) Spécificité de l'anticorps anti-HL-A .

L'étude de la spécificité a été très décevante car presque tous les sérums positifs se sont révélés contenir, non pas un anticorps monospécifique, mais un mélange d'anticorps cytotoxiques de spécificités anti-HL-A variées .

Parmi les sérums positifs faisant l'objet de ce travail, six seulement sont monospécifiques et l'anticorps qu'ils contiennent s'avère être un anticorps du système HL-A .

Il s'agit :

- d'un anticorps anti-HL-A_2(anti-Mac) dans quatre cas,
- d'un anticorps anti-HL-A_8 dans un cas ,
- d'une double spécificité anti-Da_6 + Da_{15} qui a été reconnue dans un cas .

Ces résultats sont exprimés dans le tableau VII .

	Nombre de sérums monospécifiques	*Type de la spécificité*		
		Anti HL-A_2	*Anti HL-A_8*	*Anti-Da_6 + Da_{15}*
Formes curables	3	1 cas	1 cas	1 cas
Formes léthales	3	3 cas		

Tableau VII - Spécificité des anticorps anti-HL-A dans 6 sérums monospécifiques étudiés.

Les trois seuls cas de Formes Léthales étudiés, dans lesquels le sérum contenait un anticorps monospécifique, ont montré qu'il s'agissait d'un anticorps anti-HL-A_2 (anti-Mac) . Mais à vrai dire, ces résultats n'ont aucune signification sur un nombre aussi faible de sérums étudiés .

La plus grande fréquence de l'immunisation anti-HL-A_2 dans notre série, n'offre aucun caractère pathognomonique digne d'intérêt puisque cette spécificité est connue pour être la plus commune dans tous les cas d'immunisation anti-HL-A (post-transfusionnelle ou puerpuérale) .

2°- Rapports entre l'anticorps fixant le Complément et l'anticorps cytotoxique .

Nous avons comparé la fréquence respective de ces deux types d'anticorps dans les sérums pathologiques faisant l'objet de notre étude . Le tableau VIII exprime les résultats de cette enquête .

	Formes curables	*Formes léthales*
Anticorps cytotoxiques	17 %	55,4 %
Anticorps fixant le complément	8 %	40 %

Tableau VIII - Fréquence des anticorps cytotoxiques et fixant le complément dans les formes curables et léthales de maladie hémolytique.

Il y a corrélation entre les deux types d'anticorps,cytotoxiques et fixant le Complément , selon les deux formes, curables ou léthales, de maladie hémolytique .

- D'une part, nous constatons que le pourcentage des anticorps cytotoxiques est plus élevé que celui des anticorps fixant le Complément dans l'une et l'autre forme : ceci est dû à la sensibilité de la méthode de Térasaki .

- D'autre part, nous pouvons souligner la différence encore plus significative du taux des anticorps fixant le Complément entre les formes curables et les formes léthales de la maladie hémolytique . La fréquence dans ces dernières est cinq fois plus élevée que dans les formes curables, contre trois fois par la méthode de Lymphocytotoxicité .

3°- Rapports entre les antécédents cliniques et le titre des anticorps anti-Rh comparé à la présence ou à l'absence des anticorps anti-HL-A .

Certains auteurs estiment que la concentration des anticorps anti-Rh dans le sérum maternel conditionne, seule, la gravité de la maladie fœtale .

C'est ainsi que TOVEY (1959), étudiant 143 cas de maladie hémolytique, n'a observé aucun cas de mort fœtale lorsque le taux des anticorps anti-Rh, dans le sérum maternel, était inférieur à 1/20ème par la méthode de Coombs indirect .

Nous ne pouvons pas adopter cette opinion car sur les 150 cas de maladie hémolytique qui sont l'objet de notre travail, dans huit cas sont survenues une ou plusieurs morts fœtales, alors que le taux des anticorps

dans le sérum maternel était inférieur à 1/64ème par la méthode à la Papaïne (x) . Or, et le fait mérite d' être souligné, dans ces huit cas , l'anticorps anti-HL-A était constamment associé à l'anticorps anti-Rh(titre <1/64ème) dans le sérum maternel (Tableau IX) .

Titre des anticorps anti-Rh	*Nombre de sérums étudiés*	*Nombre de sérums possédant un anticorps anti-HL-A*	*Pourcentage*
> 1/64	56	30	53,5 %
< 1/64	8	8	100 %

Tableau IX - Fréquence des anticorps anti-HL-A par rapport au titre des anticorps anti-Rh dans les formes léthales de la maladie hémolytique.

Il est singulier de constater que dans les huit cas où une mort fœtale était survenue, alors que la mère avait un titre d'anticorps inférieur à 1/64ème, l'anticorps anti-HL-A était constamment présent dans le sérum maternel .

(x) *Dans notre expérience, il y a équivalence entre le titre de 1/20ème en test de Coombs indirect, et le titre de 1/64ème en test à la Papaïne.*

B / SIGNIFICATION DES ANTICORPS CYTOTOXIQUES .

1° - Simple curiosité sérologique ?

Dans un grand nombre de cas, les anticorps cytotoxiques trouvés chez les femmes enceintes ou accouchées n'ont aucune signification pathologique . Deux femmes sur dix, sans antécédent obstétrical notable, ont dans leur sérum un anticorps cytotoxique à l'égard duquel le fœtus reste indifférent .

2° - Facteur sérologique aggravant ?

Par contre, lorsque la mère est en conflit immunologique Rh avec son fœtus, deux hypothèses peuvent être avancées :

a) L'anticorps anti-HL-A n'est qu'un phénomène sérologique secondaire à l'atteinte fœtale et nous avons déjà exposé les motifs de cette réaction immunitaire en envisageant comme possible le transfert de "matériel antigénique" provenant d'un fœtus sévèrement atteint et à travers un placenta probablement pathologique .

b) L'anticorps anti-HL-A est un des facteurs étiologiques de la sévérité de l'atteinte du fœtus . Il est possible en effet que l'anticorps cytotoxique, surajouté à l'anticorps anti-Rh, vienne aggraver la maladie hémolytique de l'enfant . Le fait que l'on trouve des anticorps cytotoxiques dans le sérum maternel trois fois plus souvent dans les formes léthales de maladie hémolytique que dans les formes curables, paraît assez significatif. Nous pouvons faire état aussi de la remarque exposée précédemment (paragraphe A de ce même chapitre)qui, manifestement , semble prouver le rôle aggravant de l'anticorps

anti-HL-A pour induire la mort du fœtus in utero, même lorsque le taux des anticorps anti-Rh se trouve être très faible dans le sérum maternel .

Deux mécanismes sont possibles et peuvent combiner leurs effets :

- L'action directe des anticorps cytotoxiques sur l'érythropoïèse : on conçoit en effet que si les anticorps anti-tissulaires trouvent sur les érythroblastes leurs récepteurs antigéniques, ils se conjugueront aux anticorps anti-Rh pour précipiter la chute du taux des hématies circulantes et conduire ainsi le fœtus dans un état d'anoxémie irréversible .

- La cytolyse généralisée avec atteintes parenchymateuses diffuses : On peut penser que les anticorps anti-HL-A trouvent leurs récepteurs antigéniques sur les cellules des parenchymes et notamment sur les cellules du foie . En effet, le mécanisme physiopathologique des formes graves de la maladie hémolytique péri-natale due à l'incompatibilité Rh fœto-maternelle n'a pas reçu, jusqu'à ce jour, d'explication entièrement satisfaisante .

Le rôle de l'anoxie fœtale, due à l'anémie , dans le déterminisme de l'anasarque fœto-placentaire, ne suffit pas à rendre compte de tous les troubles biologiques constatés au cours de cette redoutable complication . Certaines morts "in utero" ou immédiatement néo-natales demeurent incompréhensibles lorsqu'on cherche à les interpréter en fonction des critères habituels : taux des anticorps anti-Rh dans le sérum maternel, taux d'hémoglobine dans le sang fœtal, protéinémie, etc ...

Ainsi, l'immunisation anti-HL-A fournirait une explication séduisante du mécanisme physio-pathologique de l'anasarque fœto-placentaire et des morts in - utero survenant au cours de l'immunisation fœto-maternelle anti-Rh . Ces accidents pathologiques pourraient être considérés comme des phénomènes de "rejet de greffe " .

IV - PERSPECTIVES D'APPLICATIONS THERAPEUTIQUES .

Si l'on accepte l'hypothèse par laquelle l'immunisation anti-HL-A est un facteur aggravant de l'immunisation anti-Rh, il devient possible d'envisager des mesures prophylactiques à l'égard de l'immunisation anti-HL-A analogues à celles prises pour l'immunisation anti-Rh .

L'injection de gamma-globuline anti-HL-A à la femme déjà immunisée anti-Rh, après l'accouchement d'un enfant Rhésus positif (même si le test direct de Coombs est positif) ou d'un enfant Rhésus négatif , peut empêcher la formation des anticorps anti-HL-A .

En effet, il a été récemment démontré que les lots de gamma-globuline anti-Rh préparés avec des plasmas prélevés chez des femmes immunisées par des grossesses incompatibles, pouvaient contenir non seulement des anticorps anti-Rh, mais aussi, des anticorps anti-HL-A . Ces lots de gamma-globuline ont été utilisés dans la prévention de l'immunisation anti-Rh . On a constaté que cette gamma-globuline anti-Rh + anti-HL-A empêchait l'immunisation anti HL-A en même temps que l'immunisation anti-Rh :

- HARRIS et coll. (1970) ont constaté que sur 17 femmes traitées par une gamma-globuline-anti Rh + anti-HL-A après leur premier accouchement, deux seulement avaient développé des anticorps anti-HL-A au cours de leur deuxième grossesse (soit 11,8% contre 23% pour le lot témoin) .

De la même façon, sur 35 femmes traitées après le premier accouchement (MOULINIER -BURTHE: 1969) avec une gamma-globuline anti-Rh + anti-HL-A, une seulement possédait des anticorps anti-HL-A six mois après l'injection (soit 2,85 % contre 20% pour le lot témoin) .

Ces différents résultats sont exprimés dans le tableau X .

Si l'on disposait d'une gamma-globuline anti-HL-A, il serait possible de l'injecter aux femmes Rhésus négatif déjà immunisées anti-Rh, mais non encore immunisées anti-HL-A . Cette gamma-globuline anti-HL-A assurerait la prévention de l'immunisation anti-HL-A chez ces femmes particulièrement menacées . Il serait ainsi réalisé la prophylaxie des formes sévères de maladie hémolytique .

	Nombre de femmes traitées par la γ-globuline anti-D + anti-HL-A après le 1er accouchement	Nombre de femmes ayant développé des anticorps anti-HL-A		Pourcentage	LOT TEMOIN Femmes ayant reçu gamma anti-Rh dépourvue d'anti-HL-A % d'anticorps anti-HL-A développés 6 mois après l'accouchement
		6 mois après l'injection	2ème grossesse		
(1) HARRIS et coll. (1970)	17		2	11,8 %	23 %
(2) MOULINIER et BURTHE (1969)	35	1		2,85 %	20 %

(1) Titre des anticorps anti-HL-A de la γ globuline anti-D : non évalué.
(2) Titre des anticorps anti-HL-A de la γ globuline anti-D : 1/128ème.

Tableau X - Rôle de la γ globuline anti-D + anti-HL-A.

CONCLUSIONS

Nous avons recherché les anticorps cytotoxiques dans le sérum des femmes en état d'immunisation anti-Rh .

150 cas ont été étudiés . Nous les avons classés en deux groupes :

a) Les formes curables , dans lesquelles on note, dans les antécédents, la survenue d'ictères néo-nataux n'ayant pas nécessité d'exsanguino-transfusion ou pour lesquels l'exsanguino-transfusion a permis une guérison sans séquelles .

b) Les formes léthales, dans lesquelles on relève des antécédents d'anasarque fœto-placentaire, de mort intra-utérine, ou d'ictère grave non guéri par exsanguino-transfusion .

- Dans les formes curables de la maladie hémolytique néo-natale (76 cas), les anticorps cytotoxiques sont trouvés dans 13 sérums maternels, soit 17% ; c'est la fréquence habituelle des immunisations maternelles anti-leucoplaquettaires .

- Dans les formes léthales (74 cas), 41 sérums maternels, soit 55,4% possèdent des anticorps cytotoxiques: c'est une fréquence trois fois plus élevée .

Cette singulière concordance nous a fait rechercher :

a) les raisons de l'immunisation anti-HL-A au cours de l'immunisation anti-Rh (passage transplacentaire de sang fœtal, migration des lymphocytes fœtaux) favorisée par des lésions placentaires propres à la maladie hémolytique et provoquée par l'antigénicité HL-A des cellules immatures de la lignée érythrocytaire .

b) la signification pathologique des anticorps cytotoxiques que nous sommes tentés de considérer comme un facteur sérologique aggravant :

- soit par action directe des anticorps cytotoxiques sur l'érythropoïèse ,
- soit par cytolyse généralisée avec atteintes parenchymateuses diffuses évoquant un phénomène de "rejet de greffe" .

Si cette hypothèse est juste, il devient possible d'envisager des mesures prophylactiques à l'aide de gamma-globuline anti-HL-A qui, administrée aux femmes déjà immunisées anti-Rh, assurerait la prévention de l'immunisation anti-HL-A, c'est-à-dire la prévention d'un certain nombre de formes léthales de maladie hémolytique .

SERMENT

En présence des maîtres de cette École, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins je les instruirai et les soignerai sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes. Si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu,
Le Doyen :
H. BRICAUD

Bon à imprimer,
Le Président de Thèse :
R. MAHON

Vu et permis d'imprimer,
Bordeaux, le 21 Novembre 1970
Le Recteur de l'Université :
J.BABIN

ANNEXES TECHNIQUES

Annexe Technique n°1 :

REACTION DE FIXATION DU COMPLEMENT

I - PRINCIPE DU TEST .

II - MATERIEL ET REACTIFS .

III - METHODE .

1- Préparation des suspensions plaquettaires

2- Sérums

3- Complément (C')
- . Dilution du C'
- . Titrage du C'
- . Choix de la dilution du C'

4- Préparation des Hématies de mouton

5- Test proprement dit .

I - PRINCIPE DU TEST .

Il s'agit d'une méthode basée sur la capacité que présentent certains complexes Antigènes-Anticorps de fixer le C' .

Dans un premier temps :

Les Plaquettes en suspension sont mises à incuber avec le Sérum à étudier en présence du C' . Ceci afin de permettre aux Anticorps éventuellement présents dans le Sérum de se fixer sur les Plaquettes, le C' se fixant lui-même sur le complexe Antigène-Anticorps .

Dans un deuxième temps :

Un système révélateur est ajouté . Ce sont des Globules Rouges de mouton sensibilisés . Après un temps d'incubation, le degré d'Hémolyse indique la quantité de C' libre, c'est-à-dire la présence ou l'absence d'Anticorps dans le Sérum .

Dans le premier cas, le C' fixé sur le premier complexe-Antigène plaquettaire -Anticorps du sérum- ne peut entraîner l'hémolyse du deuxième système .

Au contraire si le sérum ne contient pas d'Anticorps, le C' libre vient se fixer sur les Hématies sensibilisées et l'hémolyse apparaît .

II - MATERIEL ET REACTIFS

- Tubes en plastique : tubes de Kahn TK 75x13 non gradués (x)
- Flacon-tubes à prélèvement, en plastique : 40 cc (x) (cape haute, couleur bleue)
- Tubes de centrifugation en plastique : 9 x 25 mm
- Eau physiologique : stérile, apyrogène, 9‰
- Solution d' E. D. T. A. à 5% en Eau Physiologique (xx)
- Solution d' E. D. T. A. à 2% en Eau Physiologique
- Solution d'Azothydrate de Sodium à 0,1% en Eau Physiologique R. P. n° 27.967
- Solution d'Oxalate d'Ammonium à 1% en Eau Distillée R. P. n° 21.289
- Eau Physiologique tamponnée au Véronal de Lévine et Mayer (pH : 7,4) (Tampon Véronal)

(x) *Mitard - Bordeaux.*

(xx) *Complexon III - Siegfried S.A. - Zofingue - Suisse.*

Solution mère :

Dissoudre :
- 85 g de Na Cl ..... (R. P. 21810)
- 3,75 g de 5,5 diéthyl bartiturade de sodium ..... (R. P. 23401)
  dans 1400 g d'eau bidistillée

Dissoudre :
- 5,75 g d'acide 5,5 diéthyl barbiturique (R.P. 23400)
  dans 500 ml d'eau bidistillée chaude .

Mélanger les deux solutions, et laisser refroidir à température du laboratoire .

Ajouter :
- 5 ml d'une solution de $MgCl_2$ 1M ..... (R. P. 25108)
  et de $CaCl_2$ O, 3M ..... (R. P. 22319)

Ajouter une quantité d'eau bidistillée suffisante pour amener au volume de 2000 ml .

Conserver à 4° C .

Au moment de l'emploi :

1 volume de la Solution mère
4 volumes d'Eau bidistillée .

III - METHODE

La technique décrite est dérivée de celle de Chr. Van Der WEERDT . C'est une forme simplifiée du test d'Aster et de Shulman qui a été proposée par J. COLOMBANI en France .

Essentiellement destiné à mettre en évidence des iso-anticorps anti-plaquettaires, ce test peut être adapté à la recherche des antigènes leuco-plaquettaires .

1°- Préparation des suspensions plaquettaires :

- Prélever 18 ml de sang dans un flacon-tube en plastique contenant 2 ml de Complexon à 5%
- Mélanger par plusieurs retournements
- Transvaser dans un tube en plastique à centrifuger
- Centrifuger à froid (entre 5° et 10°) pendant 10 minutes à 1000 tours/minute (200G)
- Prélever le plasma surnageant (riche en plaquettes), l'introduire dans un deuxième tube en plastique
- Centrifuger à 4000 tours/minute (1600 G) pendant 20 minutes ; ceci permet aux plaquettes de précipiter au fond du tube
- Rejeter le surnageant
- Décoller le culot par raclage sur un portoir
- Laver ce culot trois fois
  . une fois dans une solution à 1% d'oxalate d'ammonium (après cinq minutes de contact avec ce réactif-contact à prolonger à 30 minutes si le test est demandé aussitôt après le prélèvement) .

. effectuer le deuxième et le troisième lavage en eau physiologique .

- Faire une suspension finale dans une solution d'Azothydrate de Sodium à 0, 1 % en eau physiologique, jusqu'à obtenir une concentration approximative de 10^9 plaquettes/ml ; Il est conseillé d'avoir une suspension plaquettaire-étalon , dans laquelle le nombre des plaquettes a été compté, puis d'ajuster chaque suspension préparée suivant cet étalon par comparaison du trouble .
- Ne pas utiliser la suspension avant 48 heures de conservation .
- La suspension peut être conservée plusieurs mois à + 4° C.

2°- Sérums .

- Inactiver les sérums par chauffage à 56°C pendant 30 minutes .
- Les diluer au 1/2 en tampon véronal (TV) - sinon présence d'un pouvoir anti-complémentaire .

3°- Complément (C')

a) Dilution du C'

- C' de cobaye (1967-COLOMBANI)

- Sous forme de C' lyophilisé (B. D. MERIEUX)
- Faire une dilution au 1/100 en T. V.
- Pratiquer les dilutions ultérieures à partir de cette solution-mère
- Maintenir toujours le C' à + 0°C (dans un bécher rempli de glace) au cours de toutes les manipulations .

- C' humain (1968- J. et M. COLOMBANI)

- Une sensibilisation du test a été apportée par l'emploi de sérum humain
- Mélanger les sérums de plusieurs donneurs AB (sans antécédents d'iso-immunisation)
- Conserver le sang 1 heure à température du laboratoire et 2 heures à 4°C
- Séparer le sérum du caillot
- Centrifuger pendant 20 minutes à 2500 G
- Répartir le sérum obtenu en petites quantités (dans des petits tubes de 1ml bouchés)
- Congeler et conserver à - 85°C
- Ne décongeler le C' qu'une seule fois et immédiatement avant l'emploi .

b) Titrage du C' :

- C' de cobaye :

- Préparer dans six tubes en plastique des dilutions du C' au : 1/100, 1/150, 1/200; 1/300, 1/400, 1/600 (employer pour la distribution des gouttes, des pipettes Duclaux calibrant 20 gouttes/ml - 1 goutte = 0,05 ml)
- Effectuer le titrage proprement dit dans six autres tubes en plastique selon le schéma suivant :

	1/100	*1/150*	*1/200*	*1/300*	*1/400*	*1/600*
Dilution du C'	*III gouttes*	*III*	*III*	*III*	*III*	*III*
T V	*II gouttes*	*II*	*II*	*II*	*II*	*II*

- Agiter les tubes
- Incuber une heure au bain-marie (37°C)

Suspension d'hématies de mouton sensibilisées (x)	*I goutte*	*I*	*I*	*I*	*I*	*I*

- Agiter les tubes
- Incuber 30 minutes à 37° C

(x) *Voir page (préparation des hématies de mouton sensibilisées).*

- Centrifuger pendant 5 minutes à 1 600 G
- Effectuer la lecture en évaluant le degré d'hémolyse . Pour cela, on compare avec une gamme-étalon indiquant différents degrés d'hémolyse (0, 40, 60, 100). Cette gamme est préparée en hémolysant dans de l'eau distillée une dilution convenable de la suspension d'hématies de mouton sensibilisées .

- C' humain

- Pratiquer le titrage suivant la même méthode mais les ordres de grandeur diffèrent :
  . pour la solution mère de C' : 1/30
  . pour le titrage proprement dit :
  1/30, 1/40, 1/50, 1/60, 1/80, 1/100, 1/120 .

c) Choix de dilution du C' :

- Noter le titre correspondant au tube où se trouve l'hémolyse .
- Choisir une concentration deux fois plus grande pour le test .
  Par exemple : si le titre de 1/40 a été trouvé, la réaction s'effectuera avec une dilution de 1/20 .

4°- Préparation des hématies de mouton sensibilisées :

- Laver les hématies de mouton :
  . 3 fois en eau physiologique ,
  . 1 fois en Tampon véronal
- Faire une suspension à 2% en tampon véronal (ce qui correspond à une concentration d'hématies de $4 \times 10^5/mm^3$)
- Mélanger à volume égal la suspension d'hématies de mouton et de sérum hémolytique (anti-hématies de mouton) diluée au 1/1000 en tampon véronal .

- Incuber au bain-marie (37°C) pendant une demi-heure . La suspension prête à l'emploi peut être gardée pendant 24 heures à 4° C.

5°- Test proprement dit :

- Employer toujours des tubes en plastique et selon le schéma suivant :

	Tube réaction	*Témoin sérum*	*Témoin plaquettes*
Sérum (au 1/2 en T.V.)	*I goutte*	*I goutte*	*0*
Suspension plaquettaire	*I goutte*	*0*	*I goutte*
C'	*III gouttes*	*III gouttes*	*III gouttes*
Tampon Véronal	*0*	*I goutte*	*I goutte*

- Agiter les tubes .
- Incuber une heure au bain-marie (37°C) .

Suspension d'hématies de mouton sensibilisées	*I goutte*	*I goutte*	*I goutte*

- Agiter les tubes
- Incuber 1/2 heure à 37°C.
- Centrifuger 5 minutes à 1 600 G
- Lire .

Pour vérifier la sensibilité du test, il est important d'entourer la réaction, non seulement d'un témoin sérum et d'un témoin plaquette, mais aussi d'un témoin positif et négatif .

Annexe Technique n°2

REACTION DE LYMPHOCYTOTOXICITE
(microtechnique)

I - PRINCIPE DU TEST .

II - MATERIEL ET REACTIFS .

III - METHODE .

1- Préparation des suspensions lymphocytaires
. Prélèvement
. Sédimentation
. Préparation du système de filtration
. Filtration proprement dite
. Numération des lymphocytes .

2- Sérums

3- Complément (C')
. Préparation du C' de lapin
. Titrage du C'

4- Test proprement dit

5- Interprétation des résultats .

I - PRINCIPE DU TEST

Cette technique est basée sur un phénomène observé par PAPPENHEIM en 1917 . Cet auteur montre que le bleu trypan qui ne peut pénétrer les cellules vivantes, est en fait pris par les cellules endommagées . Quand un anticorps attaque un lymphocyte , il altère sa paroi, de sorte que si l'on ajoute un colorant vital tel que le bleu trypan ce dernier va pénétrer à l'intérieur de la cellule qui paraît alors bleue .

Dans un premier temps sont mis en présence, le sérum non inactivé et la suspension lymphocytaire , puis le C' est ajouté, et enfin le système révélateur sous forme de trypan bleu . Le pourcentage de cellules colorées en bleu indique la positivité ou la négativité de la réaction .

II - MATERIEL ET REACTIFS

- Erlenmeyer : verre-pyrex de 100 ml
- Billes de verre : 2 mm de diamètre
- Tubes pyrex : 20/20
- Tubes en plastique à centrifuger (9x25)
- Tubes coniques : 10 ml
- Petits tubes de verre avec bouchon (x)
- Pipettes Pasteur
- Pipettes Pasteur très effilées

- Eau physiologique : apyrogène, stérile, 9 ‰
- Eau distillée : apyrogène, stérile
- Plasmagel désodé glucosé (xx)
- Liquide de Hanks (xxx)
- Liquide de Hanks hypertonique (Hanks normal + Na Cl= 2,55 g)
- Huile de paraffine épaisse :
  Huile de vaseline épaisse du Codex (xxxx)

(x) *Moreau - 78, rue des Archives - Paris.*

(xx) *Roger Bellon.*

(xxx) *Institut Pasteur - Paris.*

(xxxx) *Cooper - Melun.*

Bleu trypan (x)

- Solution de Trypan bleu :

  Trypan bleu : 3 g
  Eau distillée : 1000 ml

- Au moment de l'emploi :

  3 volumes de trypan bleu
  1 volume de liquide Hanks hypertonique.

Solution de Sulfo-Cyanure de Potassium :

- S C N K : 3 g
- $SO_4 H_2$ (N) : 50 cc
- H_2O : 950 cc.

Fibre de nylon (xx)

- L P. 1 leukopak leucocyte filter stérile, non pyrogénic

Seringue de 30 cc (xxx)

- BD Plastipak

Aiguilles BD stériles - Yale (xxx)

- 25 g 5/8

(x) *Trypan Blue - BDH Laboratory Chemicals Division 3071840 Biochimie Rebert-Guebwiller - 68.*

(xx) *Fenwal Laboratories - Travenol - 59 - Seclin.*

(xxx) *Ets Paul Block, 39 avenue d'Iéna - Paris.*

Microseringue Hamilton (x)

- Seringue microliter N & 705 (50 λ)

Repeating dispensers (x)

- PB - 600 - 1

Détergeant DDN - 150 (xx)

- Hydromesures

Plaques de Terasaki (x)

- Plaques microtest

(x) *Ets TOUZART et MATIGNON, 3, rue Amyot - Paris.*

(xx) *30, rue A. Cayron - 92 - Asnières.*

III - METHODE .

La méthode que nous décrivons est proposée en France par DAUSSET .

Son principe a été mis au point par GORER et O'GORMAN en 1956 sur la souris . Et c'est WALFORD et surtout TERASAKI qui l'ont adaptée à l'homme .

Utilisée principalement pour la détermination des antigènes tissulaires, elle l'est aussi dans notre travail pour la détection des anticorps anti-leuco-plaquettaires .

Cette méthode peut être exécutée sous deux formes :

- En macrotechnique :

Le mélange incubé est lu en cellule de Malassez.

- En microtechnique :

De plus en plus employée, c'est elle qui a été utilisée pour toutes nos expériences . En effet, devant la rareté des sérums, elle est intéressante car 1 ml de sérum permet d'effectuer 2000 tests ; et l'on ne travaille pas avec des gouttes mais des Lambdas (1 goutte = 50 Lambdas) .

Pour la réalisation de cette technique, TERASAKI imagine des petites boîtes en plastique appelées "Plaques de Terasaki" . Le fond de celles-ci comporte des petites touches concaves . De plus, le fond est optiquement clair de façon à permettre une lecture microscopique . Une couche d'Huile de vaseline épaisse recouvre ces godets , afin d'éviter l'évaporation .

Tous les sérums (sérums-tests ou sérums à étudier) sont distribués dans chaque petite touche à raison de 1 Lambda (1 λ) sous l'huile à l'aide d'une microseringue munie de son manipulateur . Ces plaques sont

stockées dans un congélateur à -80°C . Elles ne doivent être décongelées par la suite qu'au moment de l'emploi .

1°- Préparations des suspensions lymphocytaires .

Prélèvement :

- Prélever dans un Erlenmeyer(contenant 15 petites billes de verre) 30 ml de sang
- Imprimer un mouvement de rotation à la main pendant 10 minutes
- Vérifier que la fibrine entoure bien les billes de verre.

Sédimentation :

- Transvaser le contenu de l'Erlenmeyer (sang défibriné) dans un grand tube de pyrex
- Ajouter du plasmagel glucosé, préalablement chauffé à 37° (une partie pour deux parties de sang)
- Homogénéiser par plusieurs retournements
- Aspirer les bulles restées en surface
- Placer le tube à l'étuve pendant 30 minutes :
  . 20 minutes à 45°
  . 10 minutes verticalement pour laisser déposer les hématies restées en surface .

Préparation du système de filtration :

- Prendre une seringue plastique de 30 ml
- Enlever le piston
- Adapter une aiguille fine
- Placer la seringue sur un tube plastique à centrifuger (la maintenir avec une bande de scotch)

- Introduire dans la seringue de la fibre de nylon sur une hauteur de 2 cm
- Imbiber la fibre avec du liquide de Hanks normal jusqu'à écoulement .

Filtration proprement dite

- Pipeter soigneusement le surnageant du tube de sédimentation (Plasma + leucocytes + lymphocytes + quelques globules rouges)
- Introduire celui-ci dans la seringue
- Laisser filtrer lentement (une goutte par seconde)
- Utiliser le piston en fin de filtration en surveillant que la fibre soit toujours imbibée (sinon elle laisse passer les Polynucléaires)
- Centrifuger le filtrat à 4°C pendant huit minutes à 1200 tours/minute
- Pipeter le surnageant
- Décoller le culot fait de lymphocytes et d'hématies par raclage sur les trous du portoir
- Introduire dans le tube 6 ml d'eau distillée pour hémolyser les globules rouges
- Ajouter goutte à goutte 2 ml de liquide de Hanks hypertonique pour ramener à l'isotonie
- Transvaser le contenu dans un tube de verre conique de 10 ml
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 800 tours/minute
- Rejeter le surnageant à la pipette
- Décoller le culot de lymphocytes purs
- Remettre en suspension dans deux gouttes de liquide de Hanks normal .

Numération des lymphocytes :

- Faire une dilution au 1/20 dans une solution de KSCN, c'est-à-dire :
  . une goutte de suspension lymphocytaire
  . 19 gouttes de KSCN (voir annexe technique 1)
- Mélanger
- Déposer une goutte dans une cellule de Malassez
- Compter le nombre de lymphocytes par mm^3
- Ajuster avec du liquide de Hanks à 2000/mm^3
- Vérifier d'une part la pureté de la suspension lymphocytaire, d'autre part le bon état des cellules .

2°- Sérums :

Sérums à étudier

Sérums tests .

- Employer le sérum frais , non décomplémenté
- Répartir en très petites quantités
- Congeler à -80°C et le conserver à -20° C
- Centrifuger ou filtrer les sérums infectés ou lipidiques, après traitement éliminer les sérums non limpides
- Ne pas congeler et dégeler plusieurs fois le sérum (apparition d'un pouvoir anticomplémentaire) .

3°- Complément (C')

Dans cette réaction, c'est le pouvoir complémentaire du sérum de lapin qui est utilisé .

Préparation du C' de lapin

- Prélever dans un flacon le sang de plusieurs lapins
- Placer ce sang une heure à 37°C
- Pipeter le surnageant et centrifuger à froid
- Recueillir le sérum et le maintenir à 0°C pendant toutes les manipulations suivantes
- Absorber le sérum de lapin sur des cellules humaines ainsi préparées :
  . Prélever le sang de trois donneurs sur ACD (dont deux du groupe A = antigène Forssman)
  . Effectuer quatre lavages en eau physiologique et mélanger le sang de ces différents donneurs (conserver la couche leucocytaire)
  . Centrifuger rapidement (225 G) et à froid (4°C) pendant 15 minutes
  . Décanter le surnageant en éliminant le maximum de liquide, ceci pour obtenir un culot cellulaire le plus concentré possible et comprenant globules rouges , globules blancs et plaquettes
  . mettre en contact du culot cellulaire, une quantité égale de sérum de lapin, puis mélanger
  . maintenir une heure à 0°C tout en agitant de temps en temps le mélange
- Centrifuger rapidement
- Pipeter le surnageant
- Fractionner ce sérum en petits tubes
- Congeler à -80°C et conserver à -25°C

Titrage du C'

- Titrer chaque lot de C' avant utilisation
- Employer comme sérum de référence un sérum connu cytotoxique avec toutes les variétés de cellules (sérum de polytransfusés)

- Vérifier l'absence de cytotoxicité après inactivation (chauffage à 56° C - 30 minutes) du C'
- Généralement ce C' est employé pur .

4°- Test proprement dit :

- Décongeler la plaque au moment de l'emploi
- Déposer un Lambda (1 λ) de suspension lymphocytaire sous l'huile à l'aide de la microseringue (et de son manipulateur) dans chaque godet contenant un Lambda de sérum (1 λ)
- Maintenir la plaque une demi-heure à l'étuve (37°C)
- Ajouter cinq Lambdas (5 λ) de C' de lapin décongelé au dernier moment et maintenu dans la glace
- Replacer la plaque une heure et demie à 37°C.
- Décanter lentement le surnageant sous l'huile par aspiration avec une pipette très effilée .
- Ajouter ensuite à l'aide d'une autre microseringue un lambda de trypan bleu (1 λ) préparé extemporanément
  . trois parties de trypan bleu
  . une partie de liquide de Hanks hypertonique
- Laisser en contact quelques minutes
- Procéder à la lecture avec un microscope normal au grossissement 10 pour que tout le champ soit visible .

- 1 λ Sérum
+ 1 λ Suspension lymphocytaire

1/2 heure à l'étuve (37°C.)

+ 5 λ C' lapin

1 heure 1/2 à 37°C.

+ 1 λ Trypan bleu

lecture

5°- Interprétation des résultats .

La répartition uniforme des lymphocytes est vérifiée et on établit alors un pourcentage de cellules bleues . La lecture est en général aisée, cependant dans les réactions très fortement positives, les cellules se lysent très rapidement . Elles apparaissent très pâles, à la limite de la visibilité, aussi faut-il être très attentif .

- Jusqu'à 20% de cellules détruites (donc colorées en bleu) la réaction est négative
- Entre 20 et 30% : elle est positive +
- Entre 30 et 50% : elle est positive ++
- Entre 50 et 80% : elle est positive +++
- Au-delà de 80% : elle est positive ++++

BIBLIOGRAPHIE

- BESREDKA A. (1900)
Ann. Inst. Pasteur -14, 390. 1900 .

- CHEW W. B., STEPHEN D. J., LAWRENCE J. S. (1936)
J. Immunol. 30, 301. 1936 .

- CHOWN B. (1954)
Anaemia from bleeding of the fœtus into the mother's circulation .
Lancet, 1, 1213, 1954 .

- COLOMBANI J., COLOMBANI M., BENAJAM A. & DAUSSET J. (1967)
Leucocyte and platelet antigens defined by complement fixation test (Antigens 1, 5, 6 and 14)
Histocompatibility testing 1967
Munksgaard, Copenhague, p. 413. 1967 .

- COLOMBANI J., COLOMBANI M. (1968)
Technique de Fixation du Complément sur Antigène plaquettaire .
Communication personnelle, 1968 .

- COLOMBANI J., COLOMBANI M. & DAUSSET J. (1968)
Two cases of neonatal thrombocytopenia due to maternal iso-immunization against leuco-platelet antigens.
Vox. Sang. 14, 137. 1968 .

- COLOMBANI J., COLOMBANI M., DASTOT H., ELIAS A. & DAUSSET J. (1968)
Intérêt de l'utilisation du sérum humain comme source de complément dans une réaction de fixation du complément sur antigène plaquettaire .
Soc. Franç. d'Hématologie P. 864. 1968 .

- COLOMBANI J., COLOMBANI M., ELIAS A., HUCHET J., DAUSSET J. (1969) .
Alloimmunisation fœto-maternelle anti-leucoplaquettaire .
Rev. Franç. Transf. 13-245. 1969 .

- CREGER W. P. & STEELE M. R. (1957)
Human fœtomaternal passage of erythrocytes
New Engl. J. Med. 256, 158. 1957 .

- DAUSSET J. (1954)
Leucoagglutinins and blood transfusion .
Vox. Sang. 4, 190. 1954 .

- DAUSSET J. (1954)
Présence des antigènes A et B dans les leucocytes décelés par des épreuves d'agglutination .
C. R. Soc. Biol., 148, 1607, 1608. 1954 .

- DAUSSET J. & G. MALINVAUD (1954) .
Normal and pathological platelet agglutinins investigated by means of the shaking method . Confirmation of the presence of and B antigens in platelets .
Vox. Sang. 4 204. 1954 .

- DAUSSET J., NENNA A., BRECY H. (1954)
Blood, 9, 696. 1954 .

- DAUSSET J. (1956)
Technique de recherche d'une leucoagglutinine .
Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 1 : 241. 1956 .

- DAUSSET J. (1958)
Iso. Leuco . anticorps .
Acta. Haemat. 20 156. 1958 .

- DAUSSET J., COLOMBANI J. & EVELIN J. (1958)
Présence de l'antigène Rh (D) dans les leucocytes et les plaquettes humaines .
Vox. Sang. 3, 266, 1958 .

- DAUSSET J. (1959)
Iso antigènes et iso-anticorps anti-plaquettes .
Proc. 7 th Congr. Int. Soc. Blood Transf. Rome, p 819 (Karger, Basel/New York) . 1959 .

- DAUSSET J. & Y. TANGUN (1964)
Les iso-anticorps anti-plaquettaires décelés par fixation du complément .
Transfusion (Paris) 7, 333. 1964 .

- DAUSSET J., RAPAPORT F. T., IVANYI P., COLOMBANI J. & LEGRAND L. (1965)
Rôle des antigènes leucoplaquettaires dans l'histocompatibilité , mis en évidence grâce à la pré-immunisation .
Soc. Franç. d'Hémat. Nouvelle rev. Franç. d'Hématol. 5, 6, 883-890. 1965 .

- DAUSSET J. & TANGUN Y. (1965) .
Hémotypes leucocytaires et plaquettaires à définition immunologique .
Transfusion 8, et Vox. Sang. 10, 6. 1965 .

- DAUSSET J. (1966)
Le ou les systèmes principaux de groupes tissulaires.
La Presse Médicale 74, n°44, 2251. 1966 .

- DAUSSET J., IVANYI P., COLOMBANI J., FEINGOLD N. & LEGRAND L. (1967) .
Le système HU 1 - Etudes génétiques de population et de familles .
Nouv. Rev. Franç. d'Hémat. 7, n°6, 897. 1967 .

- DAUSSET J. (1967)
Le système HU 1 .
La Presse Médicale 75, 2371. 1967 .

- DAUSSET J., COLOMBANI J., LEGRAND L., FEINGOLD N. (1968) .
Le deuxième sub. Locus du système HLA .
Nouv. Rev. Franç. Hém. 8, n°6, 841. 1968 .

- DAUSSET J., COLOMBANI J., COLOMBANI M., LEGRAND L. & FEINGOLD N. (1968)
Un nouvel antigène du système HLA (HU 1), l 'antigène 15 allèle possible des Ag 1, 11, 12 .
Nouv. Rev. Franç. Hém. 8, n°3, 398. 1968 .

- DAUSSET J., ROY L., WALFORD J., COLOMBANI J., LEGRAND L., FEINGOLD N., BARGE A., RAPAPORT F. T. (1969)
The HL-A system subloci and their importance in transplantation .
Transpl. Proced . Vol. 1, n°1 (March). 1969.

- DAUSSET J., LEGRAND L. (1969)
Antigene Da 17 : un nouvel allèle du premier sub-locus du système HL-A .
Nouv. Rev. d'Hémat. Tome 9, n°115, pp 655-662,1969.

- DAVID G. (1958)
Les anasarques fœto-placentaires par incompatibilité sanguine . Problèmes physio-pathologiques et premiers résultats thérapeutiques .
Gyn. et Obst. 57, 362. 1958 .

- DESAI G., CUTCHEON E., LITTLE B., DRISCOLL S.G. (1966)
Fœtomaternal passage of leukocytes and platelets in erythroblastosis fœtalis .
Blood, 27, 858, 1966 .

- DIAMOND L. K., and KLIMAN A. (1964)
Complement fixing platelet antibodies in pregnancy .
Abstr. 10 th Congr. Int. Soc. Blood. Transf. Stockolm 1964 .

- DOAN C. A. (1926)
J. Amer. Med. Ass. 86, 1593. 1926 .

- ENGELFRIET C. P. and Van LOGHEM J. J. (1961)
Studies on leucocyte iso and auto antibodies .
Brit. J. Haemat. 7, 223. 1961 .

- ENGELFRIET C. P., BRITTEN A. (1965)
The cytotoxic test for leucocyte antibodies .
Vox. Sang. 10, 660. 1965 .

- ENGELFRIET C. P. (1966)
Cytotoxic Iso Antibodies against leucocytes .
Thèse - Amsterdam . 1966 .

- FLEXNER S. (1902)
Penn. Méd. Bull. 15, 287. 1902 .

- HAMILTON W. J., BOYD J. D. (1966)
Nature, Lond. 212, 906. 1966 .

- HARRIS R. et ZERVAS J. D. (1969)
Reticulocyte HL-A antigens .
Nature , London, 221 , 1062. 1969 .

- HARRIS R. MACAULAY M. B., WENTZEL J. (1970)
Prevention of leucocyte antibody formation .
The Lancet. March. 14. 1970 .

- JACKSON D. P. (1967)
Immunologie aspects of the fœtus and fœtomaternal relationship .
Surgery 68, 232. 1967 .

- JENSEN K. G. (1962)
Leucocyte antibodies in serums of pregnant women .
Vox. Sang. 7, 454-469. 1962 .

- JENSEN K. G. (1962)
Leucocyte antibodies in serum of pregnant womem .
Serology and clinic .
Vox. Sagn. 7 454. 1962 .

- JENSEN K. G. (1964)
Vox. Sang. 9, 315, 1964 .

- JENSEN K. G. (1966)
Leucocyte antibodies and pregnancy . Survey .
Thesis. Copenhagen . 1966 .

- KIRBY D. R. S. (1969)
Transplant Proced. 1. 53. 1969 .

- MAHON R., MOULINIER J., CANTORNE G. & LASSALLE G. (1957)
Purpura habituel du nouveau-né par incompatibilité fœto-maternelle anti-plaquettaire .
Gyn. et Obstét. 56. 517. 1957 .

- MALINVAUD G. (1970)
Allo immunisation fœto-maternelle contre les antigènes leucocytaires et plaquettaires .
XIIIème Congr. Intern. Transf. Marseille. 1970 .

- METCHNIKOFF E. (1899)
Ann. Inst. Pasteur 13, 737. 1899 .

- MIREBEAU (1967)
Contribution à l'étude du passage transplacentaire des hématies fœtales .
Thèse Bordeaux. 1967 .

- MOULINIER J. (1952)
Essai d'interprétation physiopathologique de la maladie dite "hémolytique" du nouveau-né .
Montpellier Médical - Nov. 1952 , n° 9 .

- MOULINIER J. (1955)
Test de CAG appliqué à la recherche des anticorps anti-thrombocytes .
Sang, 26, 811. 1955 .

- MOULINIER J. (1958)
Iso immunisation maternelle anti-plaquettaire et purpura néo-natal . Le système de groupe plaquettaire "Duzo"
Proc. 6 th Congr. Europ. Soc. Haemat. Copenhague, p 817 (Karger, Basel/New-York. 1958) .

- MOULINIER J. & SERVANTIE X. (1958)
Détection par le test de consommation d'antiglobuline de l'antigène D sur les plaquettes des individus Rh + (D +) .
Vox. Sang. 3 277. 1958 .

- MOULINIER J., MERLE M. C., MESNIER F., SERVANTIE X. (1969)
Les anticorps anti-tissulaires de la femme immunisée anti-Rh.
XIIe Congr. Intern. Transf. Moscou. 1969 .

- MOULINIER J. (1970)
Signification des anticorps cytotoxiques dans les préparations d'immunoglobulines anti-D .
Conference on The Prevention of Rh Immunization - Londres - 19, 20 Mars 1970 .

- MOULINIER J., MERLE M. C. (1970)
Histocompatibilité et maladie Rhésus .
Bordeaux Médic., 4, 909. 1970 .

- MOULINIER J., MERLE M. C. (1970)
Importance des antigènes HL-A dans la pathologie gravidique et/ ou néo-natale .
Fifth Intern. Symposium on foetomaternal incompatibility - Brussels, 26. 9. 1970.

- MOULINIER J. (1970)
Anticorps cytotoxiques et Incompatibilité Rh .
Arbeitstagung zur Prophylaxe der Rhesus-Sensibilisierung mit Immunoglobulin- anti-D. Bonn, 29, 30 Mai 1970 .

- MOUREAU P. et ANDRE A. (1954)
Présence des antigènes A et B dans les plaquettes .
Vox. Sang 4, 46. 1954 .

- OVERWEG J., ENGELFRIET C. P. (1969)
Cytotoxic leucocyte iso antibodies formed during the first pregnancy .
Vox Sang. 16, 97, 104. 1969 .

- PAYNE R. (1957)
Leucocyte agglutinins in human sera .
Arch. Intern. Med. 99. 587. 1957 .

- PAYNE R. (1957)
The association of febrile transfusion reactions with leuco-agglutinins .
Vox Sang. 2, 233. 1957 .

- PAYNE R. and ROLFS M. R. (1958)
Fœtomaternal leucocyte incompatibility .
J. Clin. Invest. 37, 1756. 1958 .

- PAYNE R. (1962)
Blood, 19-411. 1962 .

- ROOD J. J VAN , A. VAN LEEUWEN & J. G. EERNISSE (1958)
Leucocyte antibodies in sera from pregnant women .
Nature 181, 1735 . 1958 .

- ROOD J. J VAN, A. VAN LEEUWEN & J. G. EERNISSE (1959)
Leucocyte antibodies in sera of pregnant women .
Vox. Sang 4, 427 . 1959 .

- ROOD J. J. VAN, A. VAN LEEUWEN & J. G. BERNISSE (1961)
Antibodies against leucocytes in sera of pregnant women .
Vox.Sang. 6 240. 1961 .

- SHULMAN N. R., MARDER V. J., HILLER M. C., COLLIER E. M. (1964)
Platelet and leukocyte iso-antigens and their antibodies : serologic, physiologic and clinical studies .
Progr. Hemat. 4, 222. 1964 .

- STEINBERG B., MARTIN R. A. (1945)
J. Immunol. 51, 421. 1945 .

- TERASAKI P. I. & M. C. CLELLAND J. D. (1964)
Microdoplet assay of human serum cytotoxins .
Nature 204, 998-1000. 1964 .

- TERASAKI P. I., MANDELL M., VANDE J. & EDGINGTON T. S. (1964)
Human blood lymphocyte cytotoxicity reactions with allogenic antisera.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 120, 322. 1964 .

- TOVEY C. H. (1959)
Prevention of stillbirth in Rh haemolytic disease .
The Lancet : Saturday 10 October 1959 .

- TOVEY G. H. , DARKE C., FRASER I. D. (1970)
Significance of HL-A cytotoxic antibodies in Rh haemolytic disease .
The Lancet, June 6, 1970 .

- WALKNOWSKA J., CONTE F. A., GRUMBAC M. M. (1969)
Practical and theorical implications of fœtal maternal lymphocyte transfer. Lancet, 1, 1119. 1969 .

- WEERDT CH. M. VAN DER , L. E. VEENHOVEN VAN RIESZ , L. E. NIJENHUIS & J. J. VAN LOGHEM (1963)
The Zw blood group system in platelets .
Vox. Sang. 8, 513. 1963 .

- WEERDT CH. M. VAN DER (1965)
Platelet antigens and iso-immunisation .
Thèse - Amsterdam. 1965 .

- WHITE H. M., JEE I. L. (1956)
Aust. Ann., Med. 5, 214. 1956 .

- ZIPURSKY A., A. HULL, F. D. WHITE & L. G. ISRAELS (1959)
Fœtal erythrocytes in the maternal circulation .
Lancet 1, 451. 1959 .

- ZMIJEWSKI C. M., ZMIJEWSKI M. E., HUNEYCUTT M. C. (1967)
The relationship of the frequencies of white cell antibodies and red cell antibodies in the sera of multiparous women .
Intern. Arch. Allergy. app. Immunol. 32. 574. 1967 .

EDITIONS BERGERET, 2 Rue Bergeret - Bordeaux .tél. 91-12-59.